

微小組織投与を目的とした **Nano-dose applicator** の可能性を評価するための
薬物の微小組織内拡散に関する研究

Studies on the drug diffusion in minimal tissues to
evaluate the potential of Nano-dose applicator as a
nano- or pico dose-drug delivery system

喜島 小翔

略語		記号	
adDDS	Accurate dosed DDS	$B.C.$	境界条件
Cal	Calcein disodium	C_d	基剤中薬物濃度
CEC	constant electric current	C_s	Stripped pig ear skin 中の薬物濃度
CLSM	共焦点レーザー走査型顕微鏡	C_{sc}	薬物の角層中濃度
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid	C_{ved}	薬物の生きた表皮・真皮中濃度
DDS	Drug Delivery System	D_s	媒質中の薬物拡散係数
		D_{sc}	角層中の拡散係数
FD-4	Fluorescein isothiocyanate-dextran ($M.W.$: 4400)	D_{ved}	生きた表皮・真皮中拡散係数
		$I.C.$	初期条件
HPLC	High performance liquid chromatography	J	透過速度 ($Flux$)
		K	ドナー/生きた表皮・真皮への分配係数
iMScope	質量顕微鏡	K_{sc}	投与側/角層の分配係数
IMS	Imaging mass spectrometer	K_{ved}	角層/生きた表皮・真皮への分配係数
IMS	Imaging mass spectrometer	L_{sc}	角層の厚み
LC	Lidocaine hydrochloride monohydrate	L_{ved}	生きた表皮・真皮の厚み
		L, x	バリアの厚み
MALDI-T OFMS	Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry	Q	累積透過量
		t	時間
		V_d	ドナー溶液の容積
MRI	Magnetic Resonance Imaging	t	時間
Nano-dose applicator	ピエゾ感圧アプリーケーター	V_d	ドナー溶液の容積
NA	Nicotinic acid		
PBS	Phosphate buffered saline		
PET	Positron Emission Tomography		

目次

緒言	7
第1章 蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価	11
第1節 理論	13
第2節 実験方法	16
2.1. 試薬	16
2.2. 実験動物と材料	16
2.3. 皮膚摘出および前処理法	16
2.4. 検量線用のブタ耳皮膚片の調製法	17
2.5. 皮膚切片の CLSM 観察手順と条件設定	17
2.6. 皮膚切片中 FD-4 蛍光強度の CLSM による測定法	17
2.7. FD-4 の <i>in vitro</i> 皮膚透過試験法	18
2.8. FD-4 定量法	19
2.9. 皮膚透過試験後の皮膚処理法	19
2.10. 皮膚組織の CLSM 画像解析法	20
2.11. 有意差検定法	20
第3節 結果	21
3.1. 種々濃度 FD-4 溶液に浸したブタ耳皮膚切片観察	21
3.2. 皮膚組織切片中 FD-4 の CLSM を用いた検量線	23
3.3. CLSM を用いた画像解析	23
3.4. 皮膚透過プロファイルおよび差分解析	25

第4節 考察	30
第5節 小括	31
第2章 非蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価	32
第1節 理論	34
第2節 実験方法	37
2.1. 試薬	37
2.2. 実験動物	37
2.3. 皮膚摘出および前処理法	37
2.4. LC の皮膚中濃度定量のための検量線用のブタ皮膚の調製法	37
2.5. 薬物の <i>in vitro</i> 皮膚透過試験法	38
2.5.1. LC の <i>in vitro</i> 皮膚透過試験法	38
2.5.2. NA の <i>in vitro</i> 皮膚透過試験法	39
2.6. NA および LC 皮膚透過試験後の皮膚処理法	39
2.7. LC の BioMap [®] 解析と輝度解析法	40
2.8. NA の BioMap [®] 解析および Image J software による輝度解析法	41
第3節 結果	43
3.1. 種々濃度 LC 溶液に浸したブタ耳皮膚切片観察	43
3.2. 皮膚組織切片中 LC の質量顕微鏡を用いた検量線	44
3.3. LC の IMS 分析および Image J ソフトウェアによる画像解析	44
3.4. LC の皮膚透過プロファイルおよび差分解析	46
3.5. IMS を用いた NA 固有シグナル解析	48

3. 6. NA のイメージング質量分析	49
3. 7. Image J ソフトウェアによる輝度解析	51
第 4 節 考察	53
第 5 節 小括	55
第 3 章 ピエゾ感圧アプリーケーター (Nano-dose applicator) により投与された蛍 光標識薬物の種々微小组織中の分布評価に関する検討	56
第 1 節 実験方法	58
1. 1. 試薬	58
1. 2. 実験動物	58
1. 3. 寒天膜の鋳型の作製法	59
1. 4. 4%寒天膜の調製法	59
1. 5. FD-4 の 4%寒天膜透過実験法	59
1. 6. FD-4 定量法	60
1. 7. FD-4 の寒天膜表面分布への適用液量の影響の測定方法	60
1. 8. 薬物分布半径変化率の算出	61
1. 9. ブタ耳皮膚、ヘアレスラット脳およびヘアレスラット肝臓の摘出 方法	61
1. 10. 検量線用のブタ耳皮膚、脳および肝臓の調製法	62
1. 11. 皮膚、脳および肝臓組織切片の CLSM 観察手順と条件設定法	63
1. 12. ブタ耳皮膚透過実験法	64
1. 13. 皮膚透過試験後の皮膚処理法	64

1. 14. 組織切片の CLSM 画像解析法	65
1. 15. 電極の作製法	66
1. 16. Cal のブタ耳皮膚透過実験	66
1. 17. Cal 定量法	67
1. 18. FD-4 適用後の脳および肝臓組織観察法および画像解析法	68
第 2 節 結果	69
2. 1. <i>In vitro</i> 4%寒天膜透過性	69
2. 2. FD-4 適用後の 4%寒天膜表面分布の経時変化に及ぼす適用液量の 影響	72
2. 3. Nano-dose applicator を用いた微量薬液適用後の皮膚組織観察	74
2. 4. Cal の皮膚透過に及ぼす CEC の影響	77
2. 5. 短時間 (5 分) CEC 併用時の Cal の皮内分布	79
2. 6. 脳および肝臓に送達された微量 FD-4 溶液の組織内分布	81
第 3 節 考察	83
第 4 節 小括	85
総括	86
謝辞	90
参考文献	91

緒言

Drug Delivery System (DDS) とは薬物を必要な部位に必要な量を必要な時間だけ作用させることを目的に設計された投与システムと定義されており¹⁾、それに含まれる薬剤放出制御、薬剤標的化および薬物吸収改善の3つの要素や剤形に関する技術を各種投与ルートや治療、診断、投与デバイスなどに応用することで高い効果を得ることが出来る。しかし、一般に薬物の投与方法には、注射、経口による投与、さらには、経皮・経粘膜投与などがあるが、DDSにおける標的化の技術を用いたとしても静脈、筋肉、皮下、肝臓や腎臓などの臓器、脳組織など特定の部位（標的部位）のみに薬物を送達することは難しく、投与した薬物は体内の他の部分に分布してしまう。今後、微小目的部位へ微量薬物を直接もしくは選択的に送達することが可能となれば、薬物の投与量自体も従来の100分の1から1000分の1以下、もしくはそれ以下にも抑えることができ²⁾、正常組織への薬物移行量の圧倒的減少によって副作用も著しく低減することができるため、患者の adherence や quality of life の大幅な改善につながる³⁾。

この数十年で狭心症の治療薬であるニトログリセリンは、舌下剤、注射剤および皮膚貼付剤など様々な剤形にすることができるようになり、必要に応じた製剤の選択が可能になった⁴⁻⁶⁾。また、難吸収性の水溶性薬物や高分子薬物などはプロドラッグ化や吸収促進剤を用いた化学的促進法、そしてマイクロニードルなどの物理的促進法に関する DDS 研究が盛んに行われているようになった⁷⁻¹¹⁾。これら投与部位の変化、吸収促進法の進歩に加えて薬物の標的化（ターゲ

ッティング) は、前述のことから効果の増強や副作用の軽減に最も大きく寄与する技術である。薬物の徐放性や生体内動態をコントロールするために微粒子運搬体や医療機器を用いた選択的薬物投与方法が試みられているが¹²⁻¹⁷⁾、これらの方法論のほとんどは経口投与と注射を念頭において研究されており、用量を著しく軽減して特定部位に投与する技術についてはまだあまり研究されていない。

一方、近年のバイオテクノロジーの進化により、タンパク質医薬品や核酸医薬品に代表されるようなバイオ医薬品の開発が進んでおり、2012 年度の世界での医薬品売上げトップ 10 の 7 つはタンパク質医薬品が占めている¹⁸⁾。バイオ医薬品は主にがんや関節リウマチおよびアルツハイマーといったアンメットメディカルニーズ疾患を対象としているため、バイオ医薬品の発展は人々の健康維持に大きく寄与できると期待される¹⁹⁻²¹⁾。しかし、バイオ医薬品の多くは投与方法が限定され、経口投与ではバイオアベイラビリティが低く、かつ吸収性に差があり、さらに高価といったデメリットもある。

そこで著者は、標的とする病巣近傍に極低用量の薬物を正確に適用することができ、さらに適用部位から直接標的部位に薬物を移動させることができれば、ターゲッティング効率を付与した DDS (以下本論文では Accurate dosed DDS, adDDS と略す) が構築できると考えた。しかし、このような adDDS を構築するためには大きく 2 つの課題を克服する必要がある。すなわち、目的部位に送達された薬物の有効性・安全性の評価には薬物の組織内分布を正しく把握する必要があるため、組織内に移行した薬物の組織中濃度分布を正しく評価する手法が求められる。薬物の組織内分布情報を画像として読み取る解析手法は、分子

イメージングというキーワードのもとで、約 100 年前のレントゲンの X 線撮影に始まり、近年では PET (Positron Emission Tomography) や MRI (Magnetic Resonance Imaging) といった医療現場でも広く用いられる手法へと大きな進歩を遂げてきた²²⁻²⁴⁾。これら分子イメージング法は生体内での標識薬物や標的部位の画像化に大変有用であると報告されてきた²⁵⁾。しかし、標的部位に送達された薬物の有効性・安全性の画像評価は定量的でない、もしくは定量精度が低いという問題が残されている。さらにもう 1 つの課題として、正確かつ微量の薬物を微小目的部位に効率的に移行させる新たなデバイスの開発や手法も必要である。経皮吸収型薬物の透過性改善方法として用いられているイオントフォレーシスやフォノフォレーシスなどの機器を用いた薬物投与はこのような未来のデバイスのプロトタイプとして参考になるかもしれない²⁶⁻²⁹⁾。特に、近年ではナノテクノロジーが急速に発展しているので新たな DDS デバイスを用いて標的微小病変部位に選択的でかつ低用量の薬物を送達することが可能になるかもしれない。

これらの多様な背景および課題を勘案し、本研究では、副作用を抑え、かつ最大限の治療効果を期待できる微量の薬物を微小目的部位へ直接的にかつ効率的に送達するシステムの開発のための基礎的検討として、微小組織中の薬物分布を評価する方法について研究を行った。すなわち、第 1 章では、摘出皮膚をモデル組織として選択し、蛍光標識薬物の組織中深さ方向（一次元）concentration-distance profile について共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）によって画像評価を行い、Fick の拡散式に従う差分法によって皮膚透過プロファイルから予測した一次元 concentration-distance profile と比較した。また、第 2 章

では、近年開発されたイメージング質量分析法³⁰⁻³⁴⁾、すなわち光学顕微鏡と MALDI-TOFMS (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) を搭載した質量顕微鏡 (iMScope、株式会社島津製作所、京都、日本) を用い、非蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析法について検討を行った。さらに第 3 章では、ピエゾ感圧アプリーケーター (Nano-dose applicator) を用いて微量薬液を投与した後の薬物の摘出組織内分布を評価した。すなわち、第 1 章と同様蛍光標識薬物を用い、CLSM 画像による三次元薬物分布評価を行った。Nano-dose applicator は、数ピコナノリットル単位で吐出量を制御できることから、モデル薬物投与デバイスとして選択した。また、薬物の標的部位への移行促進や制御への定電流 (イオントフォレーシス) 併用の効果も合わせて評価した。摘出皮膚をモデル組織として主に用い、さらに、摘出皮膚以外の他組織として、摘出肝臓および脳についても検討した。

第1章 蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価

一般的に、組織に適用された薬物は血中に移行して作用を発現する。また、その有効性や安全性を評価するには、薬物を投与した後の血液中や血漿中濃度を測定し、バイオアベイラビリティを知ることが重要となる。一方、皮膚局所で作用を示す医薬品、医薬部外品や機能性化粧品等の安全性や有効性の予測では、血（血漿）中ではなく皮内、特に皮内の各作用部位（深度）濃度を正しく評価することが重要である。これまでの皮膚中薬物濃度測定法としては、suction blister 法³⁵⁾、punch and shave biopsies 法³⁶⁾、tape-stripping 法³⁷⁻⁴²⁾および homogenization 法⁴³⁾等がある。しかし、これらの方法のほとんどは薬物の皮膚中平均濃度を評価できるものの、皮膚中各深度の濃度を評価するには更に種々の実験装置が必要であったり、多くのサンプルの測定が必要であったりする問題が残されていた。

Sugibayashi ら⁴⁴⁾は、以前より数学的手法を用いた皮膚中濃度の予測研究を行っており、薬物の透過パラメータを用いて皮膚中濃度を算出する方法を報告している。この予測において、皮膚局所適用薬物の皮内動態は Fick の第2拡散則に基づく差分法により計算できること、さらに皮膚を「角層」と「生きた表皮・真皮」の2層からなる two-layered model を用いることで、それぞれの層中の薬物濃度を各深部での薬物濃度として評価可能であることを報告した^{45,46)}。しかし、拡散モデルを用いる数学的手法は、有用ではあるものの、薬物の物理化学的パラメータによって評価できる薬物が限られることや高度な数学的知識と理解が

必要といった問題がある。また、組織の均一性を仮定する必要があるため構造が複雑な組織では薬物の組織内各部位での詳細な分布まで評価できない。さらに、「生きた表皮・真皮」に関するパラメータを得るためには、角層を除去した *stripped skin* を用いた実験も必要となる。そのため、組織内の詳細な薬物分布を直接的に、かつ薬物種に限定されない方法で測定・評価できる方法論の確立が待望されている。

一方、画像イメージング技術の発展に伴い、蛍光物質や PET 核種を用いた薬物の体内動態解析が盛んに行われるようになった⁴⁷⁻⁵⁵⁾。これらを参考にして、著者は皮膚適用された薬物の皮内分布部位や浸透経路を直接的にかつ簡便に評価できると考えられる共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いた画像解析法に注目した。

第 1 章では、顕微鏡画像による皮内動態解析の可能性について調べるため、角層を除去した *stripped pig ear skin* を用いて薬物適用後の一次元 *concentration-distance profile* の数値化を試みた。また、Fick の拡散則の差分式により角層除去皮膚中の *concentration-distance profile* を皮膚透過プロファイルから予測し、これら両者を比較し、画像解析による蛍光標識剤の皮膚中濃度評価の有用性を評価した。以下、fluorescein isothiocyanate-dextran (4 kDa; FD-4) をモデル薬物として得られた結果を論述する。

第 1 節 理論

1 層膜の concentration-distance profile の解析方法⁵⁶⁻⁵⁹⁾

Figure 1 に模式的に 1 層膜と仮定できる膜中の透過実験中の concentration-distance profile を示す。

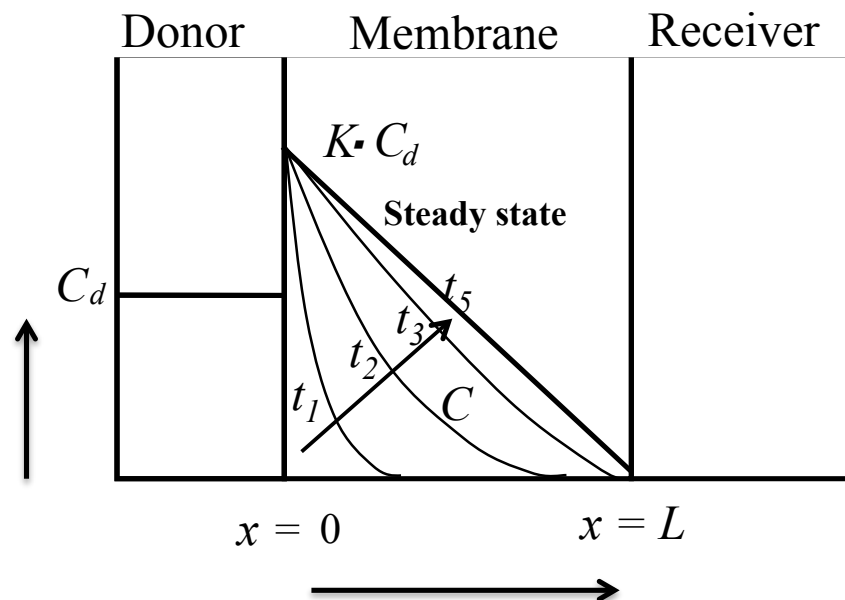


Fig. 1 Schematic diagram of concentration-distance profile through stripped pig ear skin (one-layered diffusion model).

時間 t 、深度 x における薬物濃度 C_s は、Fick の第 2 法則から以下のように表される。

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 C_s}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 D_s は媒質中の薬物拡散係数を示す。

Stripped pig ear skin が 1 層膜としてふるまう場合、本実験での初期条件 (I.C.) および境界条件 (B.C.) は以下のようになる。

$$\begin{aligned}
 \text{I.C.} \quad & t=0 \quad 0 < x < L \quad C_s = 0 \\
 \text{B.C.} \quad & t > 0 \quad x=0 \quad C_s = KC_d \quad V_d \frac{dC_d}{dt} = D_s \frac{dC_s}{dx} \\
 & x=L \quad C_s = 0
 \end{aligned} \tag{2}$$

ここで、 L はバリア層の厚みであり、stripped pig ear skin の厚みと考えることが出来る。 K はドナー側から stripped pig ear skin 表面、すなわち生きた表皮への薬物の分配係数、 C_d は基剤中薬物濃度、 C_s は stripped pig ear skin 中各深さでの薬物濃度、 V_d はドナー溶液（または基剤）の容積を示す。

時間 t 、位置 x での C_s の濃度変化は、式 (1)、式 (2) にしたがう。薬物のレシーバー側への透過速度 J は Fick の第 1 法則である式 (3) で表すことができる。さらに、 J を積分することにより薬物の累積皮膚透過量 Q が求められる (式 (4))。

$$J = -D_s \left(\frac{dC_s}{dx} \right)_{x=L} \tag{3}$$

$$Q = -D_s \int_0^t \left(\frac{dC_s}{dx} \right)_{x=L} dt \tag{4}$$

また、式 (1) の左辺と右辺は差分法⁵⁴⁾により、式 (5)、(6) に変換できる。

$$\frac{dC_{s_{i,j}}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{s_{i,j+1}} - C_{s_{i,j}}) \tag{5}$$

$$D_s \frac{d^2 C_{s_{i,j}}}{dx^2} = \frac{D_s}{\Delta x^2} (C_{s_{i-1,j}} - 2C_{s_{i,j}} + C_{s_{i+1,j}}) \tag{6}$$

ここで、 $C_{si,j}$ は i 番目の位置の j 番目の時間の stripped pig ear skin 中薬物濃度を表す。また、 Δt は $t_{j+1}-t_j$ を、 Δx は $x_{i+1}-x_i$ を表す。式 (5)、(6) を式 (1) に代入すると次式が得られる。

$$C_{s_{i,j+1}} = rD_s C_{s_{i-1,j}} + (1-2rD_s)C_{s_{i,j}} + rD_s C_{s_{i+1,j}} \quad (7)$$

ここで、 r は $\Delta t/\Delta x^2$ を示す。また、式 (3) は差分法を用いると式 (8)、式 (4) は式 (9) で表すことができる。

$$J_j = -D_s \frac{C_{n+1,j} - C_{n,j}}{\Delta x} \quad (8)$$

$$Q_j = Q_{j-1} + J_j \cdot \Delta t \quad (9)$$

ここで、 n は皮膚の分割数を示す。各パラメータは表計算ソフト Microsoft® Excel 中の付属プログラムを用いて計算した。計算には $n=10$ を用いた。拡散係数 D_s と分配係数 K は、*in vitro* 皮膚透過試験から得られた累積皮膚透過量 Q の実測値を非線形最小二乗法にてカーブフィッティングすることにより算出した。算出した D_s および K を用いて stripped pig ear skin 中各深さの FD-4 濃度を算出した。計算では $D_s \cdot \Delta t/\Delta x^2$ が 0.5 以下になるように Δt および Δx を設定した。

第2節 実験方法

2.1. 試薬

Fluorescein isothiocyanate-dextran (4 kDa; FD-4) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。テープストリッピングに用いたセロハンテープはニチバン株式会社 (東京、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級品を用いた。なお、これらの試薬は精製せずにそのまま用いた。

2.2. 実験動物と材料

三元豚の耳 (ブタ耳) は株式会社埼玉実験動物供給所* (埼玉、日本) から食用のブタ耳を購入した。

2.3. 皮膚摘出および前処理法

FD-4 を用いた実験に使用した皮膚は、ブタ耳皮膚表面を傷つけないように丁寧に水洗し、水分をよく拭き取り、セロハンテープを用いて角層側に 50 回テープストリッピングを行い、角層を除去した。その後、メスを用いて必要面積部分を摘出し、電動ダーマトーム (Acculan 3Ti Dermatome, Aesculap-a B.Braun Company, Melsungen, Hessen, Germany) を用いて表皮側より下層に向けて厚さが約 1000 μm となるように皮膚を切りとり、stripped pig ear skin を調製した⁶⁰⁾。

*現在、東京実験動物 (東京、日本) に全業務を委託した。

2. 4. 検量線用のブタ耳皮膚片の調製法

摘出した stripped pig ear skin を適当な大きさに切り分け、種々濃度 (0.05、0.50、1.00、2.50、4.00、5.00 mM) に調製した FD-4 溶液中に完全に浸かるように入れた。また、コントロール (FD-4 濃度=0) として、stripped pig ear skin 片を等張リン酸塩緩衝液 (PBS、pH7.4) 中に同様に完全に浸かるように入れた。24 時間静置後、すべての皮膚片を取り出し、凍結包埋剤 (OTC コンパウンド、Super Cryoembedding Medium、株式会社 Section-Lab、広島、日本) を用いて皮膚表面に対して垂直方向の切片が得られるように皮膚を立てた状態で包埋し、-20°C イソペンタン中で速やかに凍結させた。

2. 5. 皮膚切片の CLSM 観察手順と条件設定

2. 4. の方法で包埋した皮膚片よりクライオスタット (CM3050、LEICA、Wetzler, Hessen, Germany) を用いて垂直方向に厚み 10 μm の皮膚切片を作製した。作製した皮膚切片は CLSM を用いて FITC に起因する蛍光を観察した。FD-4 を用いた場合の CLSM の条件は、Wave length を 473 nm、Scan speed を 200 $\mu\text{s}/\text{pix}$ 、Laser power を 1%、HV を 236 V、Gain を 1.125 x、Off set を 0 とした。

2. 6. 皮膚切片中 FD-4 蛍光強度の CLSM による測定法

CLSM より得られた皮膚切片の蛍光画像 1 枚につき蛍光強度を算出するための解析ポイントとして 50 (5 \times 10) 個を選択し、各ポイントの蛍光強度を測定し、得られた全プロットの蛍光強度の平均値を算出した。Figure 2 にプロット例を示す。また、FD-4 を含まない PBS に浸した皮膚切片の画像から自家蛍光強

度を求め、種々濃度 FD-4 溶液に浸した皮膚切片から得られた蛍光強度から差し引き、各 FD-4 濃度の蛍光強度とした。

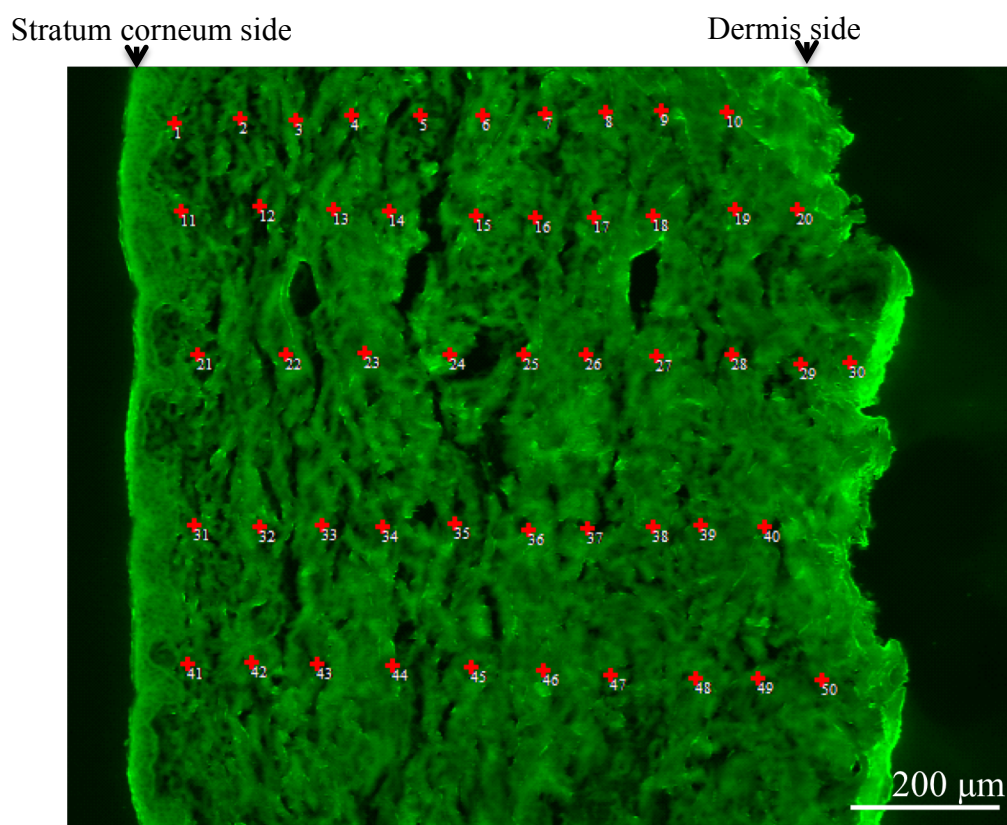


Fig. 2 Example of a CLSM observation image for the calibration of FD-4 fluorescence intensity in stripped pig ear skin.

2. 7. FD-4 の *in vitro* 皮膚透過試験法

2. 3. の方法で調製した stripped pig ear skin は、表皮側を上向きに縦型拡散セル (有効透過面積 1.77 cm²) にセットした。次に、皮膚からレシーバーに漏出する

自家蛍光の影響の軽減し、かつ角層を水和するため、表皮側に 1.0 mL、真皮側に 6.0 mL の PBS を適用し、1 時間放置した。その後、表皮側に適用した PBS を回収し、真皮側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を真皮側に補充した。その後、表皮側には PBS に溶解させた 5 mM FD-4 溶液を 1.0 mL 適用し、5 時間（定常状態）および 0.5 時間（非定常状態）の透過試験を行った。実験中、セル内の温度は 32 °C に保ち、真皮側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで常時攪拌した。経時的に真皮側から 0.5 mL サンプリングし、その都度、同量の PBS を補充した。

2. 8. FD-4 の定量法

得られたサンプル中の FD-4 濃度は蛍光分光光度計（RF-5300PC、株式会社島津製作所、京都、日本）を用いて測定した。すなわち、FD-4 のサンプル溶液は遠心分離（18,800×g、5 min、4 °C）し、その上清 300 μL を蛍光分光光度計にて励起波長 490 nm、蛍光波長 520 nm の条件で測定した。

2. 9. 皮膚透過試験後の皮膚処理法

透過試験終了後にドナーおよびレシーバー溶液を除去して stripped pig ear skin を回収し、生きた表皮および真皮表面に付着している薬物を PBS にて洗い流した。その後、皮膚垂直切片が得られるように凍結包埋剤を用いて包埋し、-20°C イソペンタン中で速やかに凍結させ、クライオスタットを用いて皮膚に対し垂直方向に厚み 10 μm の皮膚組織切片を作製した。作製した皮膚組織切片は CLSM を用いて観察した。なお、CLSM 測定条件は、2. 5. の条件と同様である。

2. 10. 皮膚組織の CLSM 画像解析法

皮膚組織切片の CLSM 画像の蛍光強度を算出するため、解析ポイントとして生きた表皮側 ($x=0$) から 6 個を選択した。これを異なる 4 ヶ所で行い、各ポイントの蛍光強度を測定した。また、各ポイントで皮膚表面からの深度が同じ蛍光強度データを用い、深さ方向の皮膚中濃度を平均値として算出した。Figure 3 にプロット例を示す。

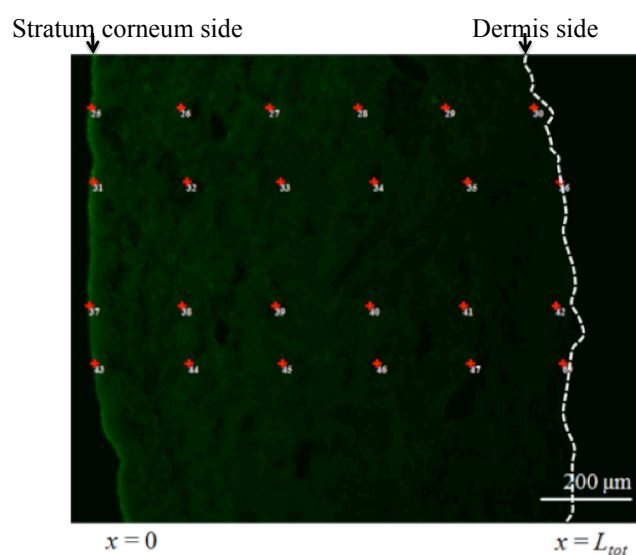


Fig. 3 Example of a CLSM observation image for FD-4 fluorescence intensity in stripped pig ear skin after the permeation experiment. Dashed line: boundary of the skin.

2.11. 有意差検定法

CLSMを用いた皮膚組織切片中のFD-4濃度の検量線は決定係数 R^2 で評価し、検定には、分散分析を用いた。危険率5%未満を有意と判定した。

第3節 結果

3.1. 種々濃度 FD-4 溶液に浸したブタ耳皮膚切片観察

Figure 4 に種々濃度 FD-4 溶液に浸した stripped pig ear skin 組織切片の CLSM 観察結果を示す。Fig. 4g はコントロール（0 μM の FD-4 適用時）である。浸した FD-4 濃度が高くなるにつれ（Fig. 4a→f）、得られる画像中の蛍光色の明度・彩度が高くなった。皮膚切片の両端の部分は、中央と比べて、若干緑色蛍光が明るいことが確認できたが、中央部はいずれのサンプルもほぼ同程度の明るさを有していた。

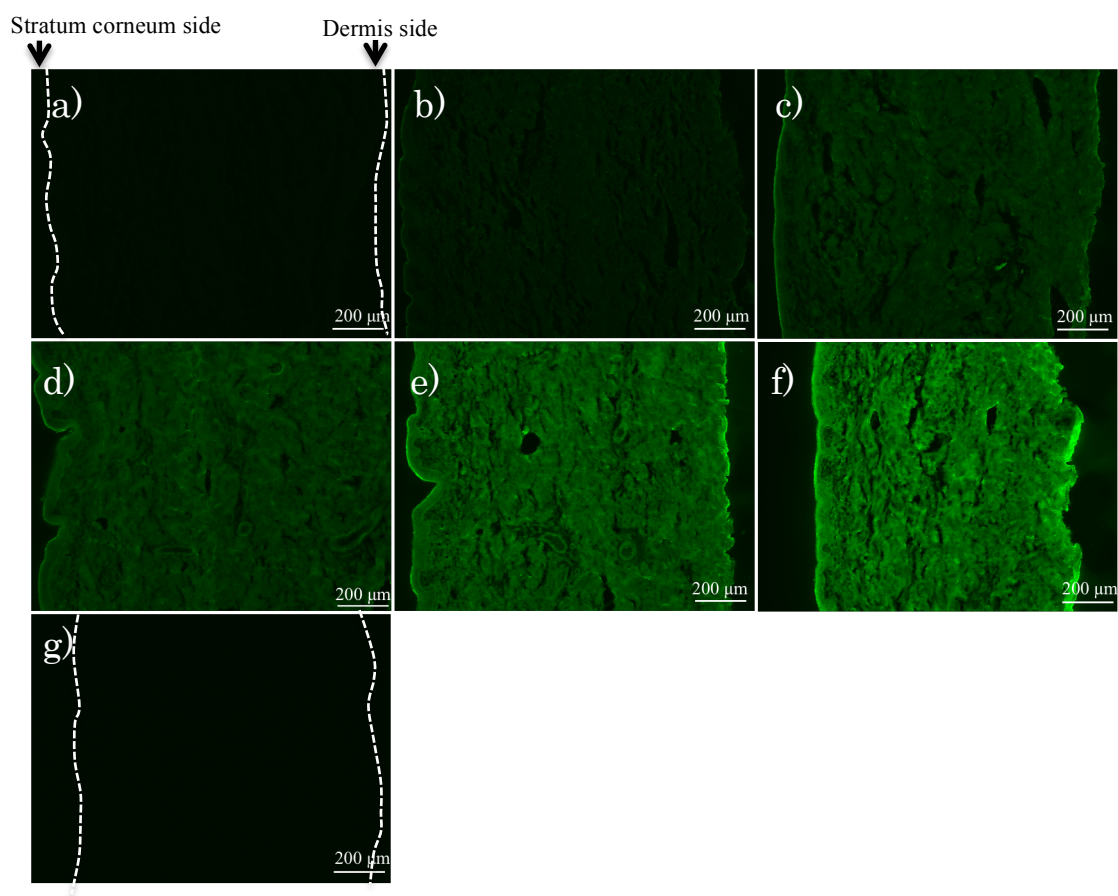


Fig. 4 CLSM images for FD-4 fluorescence intensity in stripped pig ear skin after immersions in solutions with different concentrations of FD-4 solutions. Dashed line: boundary of the skin sample.

a) 0.05 mM (183.45 $\mu\text{g/mL}$), b) 0.5 mM (1834.5 $\mu\text{g/mL}$), c) 1 mM (3669.0 $\mu\text{g/mL}$), d) 2.5 mM (9172.5 $\mu\text{g/mL}$), e) 4 mM (14676 $\mu\text{g/mL}$), f) 5 mM (18345 $\mu\text{g/mL}$), and g) 0 mM (control). Dashed line: boundary of the skin sample.

3. 2. 皮膚組織切片中 FD-4 の CLSM を用いた検量線

Figure 5 に Fig. 4 に示した画像から得られた stripped pig ear skin の FD-4 の蛍光強度の平均値を適用濃度に対してプロットした検量線を示す。この検量線から明らかなように、画像から得られた蛍光強度と FD-4 濃度の間に極めて直線性が高い有意な関係 ($R^2=0.99636$) が得られた。

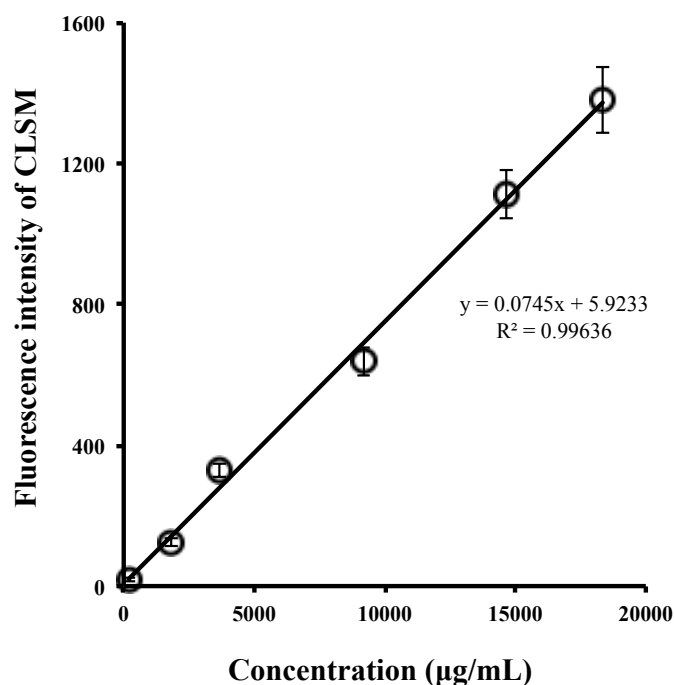


Fig. 5 Relationship between FD-4 fluorescence intensity observed by CLSM and the concentration of FD-4 applied. Each point shows the mean \pm S.D. ($n = 50$).

3. 3. CLSM を用いた画像解析

透過試験終了後の皮膚組織切片を観察し、得られた CLSM 画像から皮膚中の蛍光強度を測定した。Figure 6 に透過試験終了後（定常状態時）の皮膚組織切片

の CLSM 画像を示す。また、Fig. 7 には適用 0.5 時間後の非定常状態時の皮膚組織切片の画像を示す。定常状態および非定常状態とも生きた表皮側から真皮側へ向かって FD-4 による緑色蛍光の明度の減少を確認することができた。なお、stripped pig ear skin の FD-4 適用表面付近の蛍光強度が著しく高く、また、レーザー側表面の蛍光強度は安定しなかったため、両表面付近の蛍光強度については定量に用いなかった。その他については Fig. 5 の検量線を用いて FD-4 濃度に換算した。

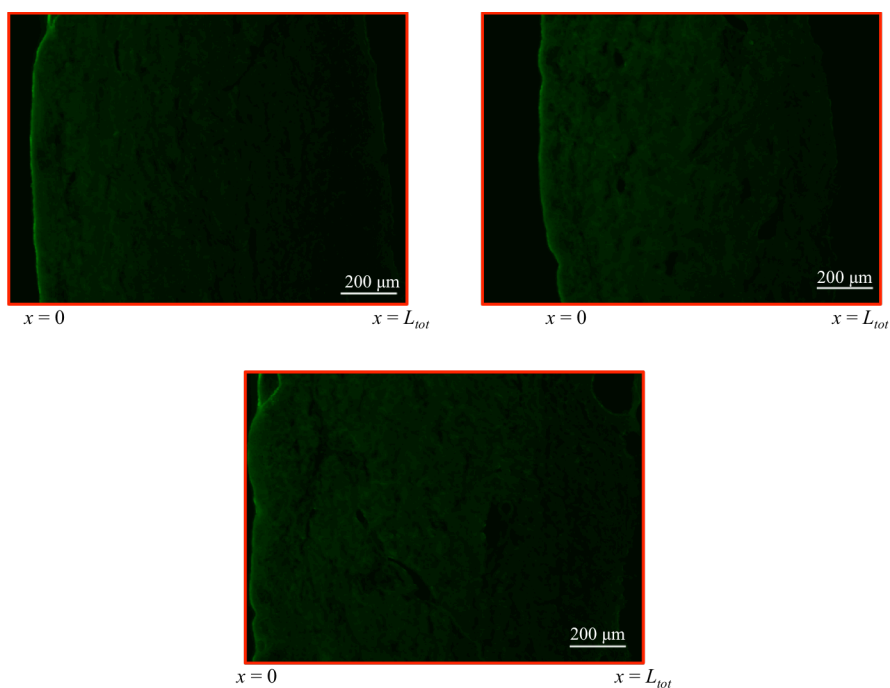


Fig. 6 CLSM images of FD-4 fluorescence intensity in stripped pig ear skin in the steady state (5 h) after the permeation experiment. a), b) and c) show samples A, B and C, respectively.

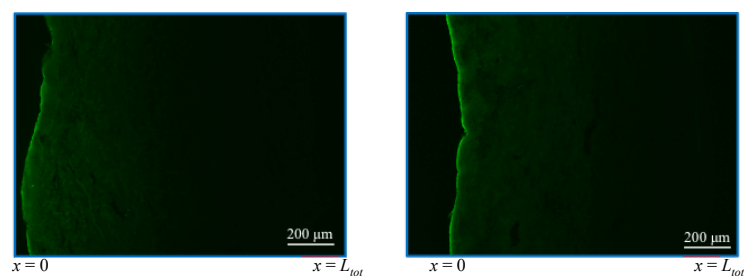


Fig. 7 CLSM images of FD-4 fluorescence intensity stripped pig ear skin in the non-steady state (0.5 h) after the permeation experiment. a) and b) show samples A and B, respectively.

3. 4. 皮膚透過プロファイルおよび差分解析

Figures 8 に皮膚中濃度を算出するために、異なる 3 枚の stripped pig ear skin に 5 mM FD-4 を適用した後の *in vitro* 皮膚透過プロファイルを示す。典型的な薬物の累積皮膚透過プロファイルが得られ、さらに、3 つのサンプルは類似したプロファイルを示した。Stripped pig ear skin 透過実験から得られた透過プロファイルより K 、 D_s を算出した。その結果を Table 1 に示す。また、Stripped pig ear skin 透過実験から得られた透過パラメータ (Table 1) を用いて、第 1 節に示した解析法を用いて定常状態時における concentration-distance profile を算出した。その計算結果を点線で実験終了時の CLSM を用いた観測値とともに Fig. 9 に示す。実測値と計算値はよく一致し、生きた表皮 ($x=0$) から真皮下部 ($x=L$) へ皮膚深度が深くなるにつれて皮膚中濃度が直線的に減少することが確認された。また、いずれのサンプルにおいても皮膚中濃度プロファイルはよく類似していた。

さらに、非定常状態時の FD-4 の皮膚中濃度分布を調べるために、Fig. 8 に示したプロファイルから適用 0.5 時間後の非定常状態時における concentration-distance profile を Table 1 に示した透過パラメータを用いて、第 1 節に示した解析法を用いて算出した。別に 0.5 時間透過実験を行い、CLSM を用いて得た実測値と併せて Fig. 10 に示す。この場合も実測値と計算値はよく一致して、非定常状態では生きた表皮から真皮下部へ皮膚深度が深くなるにつれて曲線的に皮膚中濃度が減少した。また、Fig. 9 同様に Fig. 10 で示した皮膚中濃度プロファイルもサンプル間でよく一致した。

以上、Figs. 8-10 より stripped pig ear skin 透過挙動から第 1 節に示す手法を用いることによって、stripped pig ear skin 中 FD-4 の concentration-distance profile が求められることができ、その値は CLSM を用いた実測値と良く一致することが明らかとなった。

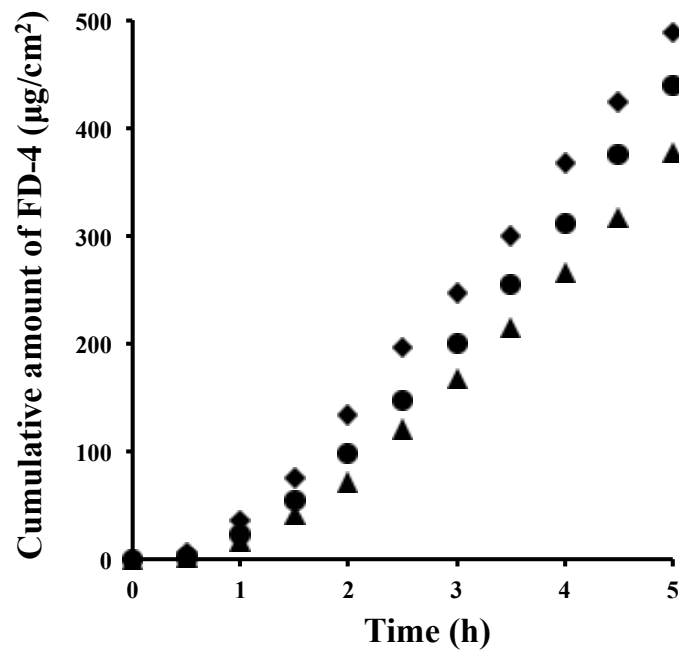


Fig. 8 Time course of the cumulative amount of FD-4 that permeated through stripped pig ear skin.

Symbols: ●: sample A, ◆: sample B, ▲: sample C.

Table 1 Permeation parameters of FD-4 through stripped pig ear skin

Drug		Parameters
FD-4	D_s (cm ² /h)	1.37×10^{-3}
	K (-)	0.45

D_s : diffusion coefficient in variable epidermis and dermis.

K : partition coefficient.

Thickness of skin: 1000 µm.

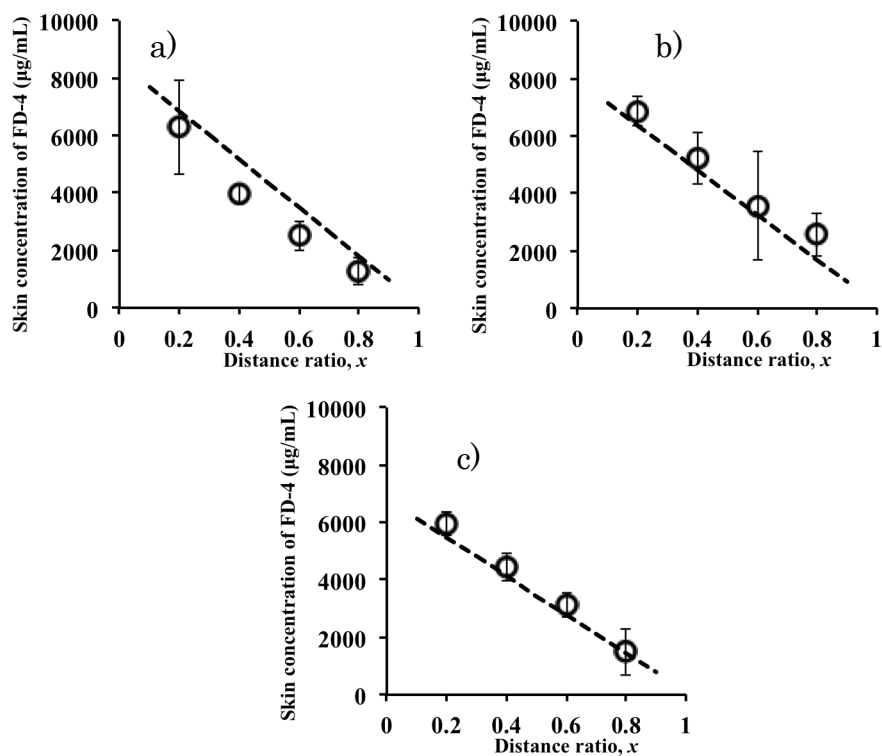


Fig. 9 Concentration-distance profile of FD-4 in the steady state (5 h).

Symbols (○): Observed values from image analysis, Dashed line: Calculated value by the difference equation based on Fick's law of diffusion from the skin permeation profile. Each point shows the mean \pm S.D. ($n = 4$). a), b) and c) correspond to samples A, B and C, respectively.

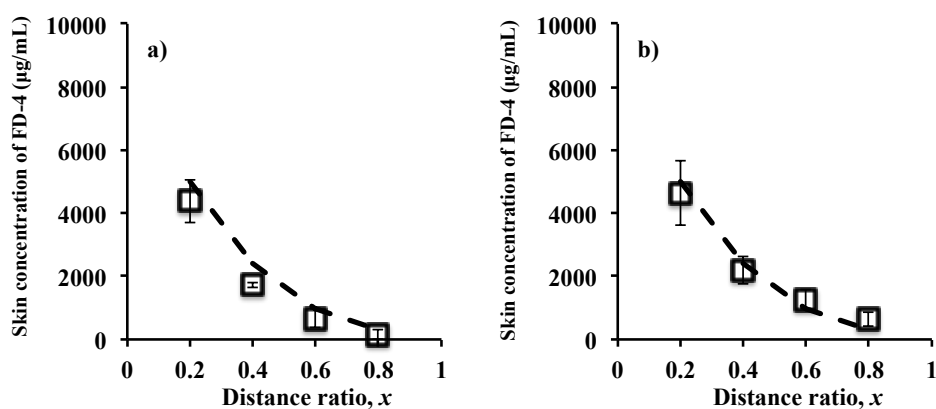


Fig. 10 Concentration-distance profile of FD-4 in the non-steady state (0.5 h).

Symbols (\square): Observed value from image analysis, Dashed line: Calculated value by the difference equation based on Fick's law of diffusion from the skin permeation profile. Each point shows the mean \pm S.D. ($n = 4$). a) and b) correspond to samples A and B, respectively.

第4節 考察

Stripped pig ear skin を浸した溶液中の FD-4 濃度と各 CLSM 画像から得られた蛍光強度の間に直線関係が得られたことから (Fig. 5)、CLSM を用いることにより、皮膚中の蛍光標識薬物濃度の定量的評価が可能であると考えられた。また、CLSM を用いた画像解析より得られた FD-4 の実測値は皮膚透過プロファイルより Fick の法則から導いた差分法を用いて算出した計算値と、定常状態時 (Fig. 9) および非定常状態時 (Fig. 10) とともに極めて近似した。これらのことから、stripped skin であれば生きた表皮・真皮中の蛍光標識剤の concentration-distance profile を画像解析と拡散モデルを用いた計算のどちらの方法でも評価できると考えられた。しかし、Figs. 6、7 にみられるように生きた表皮表面の蛍光強度は著しく高くなる傾向が見られたことから、生きた表皮表面付近の薬物量を過大評価する可能性があると考えられた。また、最も深いレーザー側近くの濃度も安定しなかった。本研究では角層除去を施した皮膚でしか検討を行っていないため、今後は、full-thickness skin を用いた検討も行う必要があるだろう。その際、CLSM では厚さが 15-20 μm 程度しかない表皮の角層部分を評価するのが難しいため、角層部分の濃度挙動については透過試験終了後に角層をテープストリッピングして測定するといった他の方法を組み合わせる工夫も必要になると考えられた。また、本研究で使用した FD-4 は分子量が大きいため角層を介して皮内への浸透はほとんどないと予想されるため、低分子蛍光標識剤についても評価を行う必要がある。

第5節 小括

本研究により、摘出実皮膚を用いて CLSM を用いた蛍光物質の検量線が作製でき、かつ蛍光物質の定量を行うことが可能であることが示された。

また、本方法で得た stripped pig ear skin における定常状態時および非定常状態時の FD-4 の concentration-distance profile は数学的解析から得られた値と極めて近似したことから、蛍光標識剤と CLSM を用いた生きた表皮・真皮中の各深度濃度評価法は、極めて有用であると考えられた。

第 2 章 非蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価

前章では、CLSM 画像解析による蛍光標識薬物の皮膚中濃度評価について検討した。その結果、stripped skin においては、画像解析より得られた皮膚中 concentration-distance profile が Fick の拡散則に基づいた差分法を用いて透過プロファイルより算出したものと同等で、両方法とも皮内深部に浸透した薬物の各深度濃度評価に有用であることが明らかになった。しかし、CLSM を用いた手法は簡便ではあるものの、応用できる薬物が蛍光物質または蛍光標識体に限られることから非蛍光標識薬物を用いた画像解析測定法の確立も大変重要である。

一般に、組織の病態像の評価には顕微鏡観察法や組織染色法が用いられてきた^{61, 62)}。しかし、これらだけでは病変部位等の形態変化が一体何に起因するのか、また、どのような成分によるのか明らかにすることはできない。このような状況下、近年、質量分析装置を用いて病理組織切片上にある生体分子や代謝物の局在を直接可視化する Imaging mass spectrometer (IMS) 法が発展した⁶³⁻⁶⁷⁾。IMS 法では、このような利点から、医学・薬学・農学・工学分野への応用が期待されている。

本章では、モデル薬物として Lidocaine hydrochloride monohydrate および Nicotinic acid を選択し、質量顕微鏡 (iMScope) を用いた画像解析による濃度分布評価を行った。また第 1 章と同様皮膚透過試験から得られる皮膚透過挙動より concentration-distance profile を算出し、画像解析の結果と比較することで、

iMScope 画像による皮膚中濃度評価の有用性について検討した。

第 1 節 理論

1 層膜の concentration-distance profile の解析方法は前章で示した方法と同様である。

本章では新たに 2 層膜の concentration-distance profile の解析方法について示す。Figure 1 に 2 層膜と仮定した角層を有する full-thickness pig ear skin の定常状態時の薬物濃度推移を模式化して示す。すなわち、full-thickness pig ear skin を角層と生きた表皮・真皮からなる 2 層膜と仮定して、Fick の拡散則を用いて薬物の皮膚透過挙動を解析した。薬物の角層中濃度 C_{sc} と生きた表皮・真皮中濃度 C_{ved} は以下の式で表すことができる。

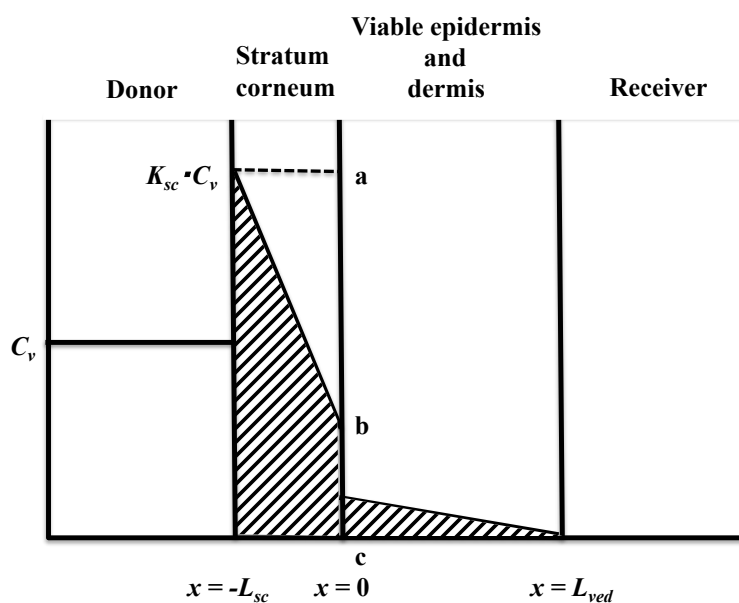


Fig. 11 Schematic diagram of a concentration-distance profile in full-thickness pig ear skin (two-layered diffusion model).

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (10)$$

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (11)$$

ここで、 D_{sc} は角層中拡散係数、 D_{ved} は生きた表皮・真皮中拡散係数を示す。本実験での初期条件 (I. C.) および境界条件 (B. C.) は以下のように仮定した。

$$\begin{aligned} \text{I. C.} \quad & t=0 \quad -L_{sc} < x < 0 \quad C_{sc}=0 \\ & 0 < x < L_{ved} \quad C_{ved}=0 \\ \text{B. C.} \quad & t>0 \quad x=-L_{sc} \quad C_{sc}=K_{sc}C_v \\ & x=0 \quad C_{ved}=K_{ved}C_{sc} \text{ および } D_{sc} = \frac{dC_{sc}}{dx} = D_{ved} \frac{dC_{ved}}{dx} \\ & x=L_{ved} \quad C_{ved}=0 \end{aligned} \quad (12)$$

C_{sc} および C_{ved} は、Fick の拡散第 2 法則に従って変化すると仮定すると差分法を用いて計算できる。 K_{sc} は投与側から角層への分配係数、 K_{ved} は角層から生きた表皮・真皮への分配係数を示す。薬物の full-thickness pig ear skin 透過速度 $Flux$ は式 (13) で、また、単位面積当たりの full-thickness pig ear skin 累積透過量 Q は式 (14) で表すことができる。

$$Flux = -D_{ved} \left(\frac{\partial C_{ved}}{\partial x} \right)_{x=L_{ved}} \quad (13)$$

$$Q = -D_{ved} \int_0^t \left(\frac{\partial C_{ved}}{\partial x} \right)_{x=L_{ved}} \partial t \quad (14)$$

また、式 (10) は式 (15) および式 (16) に、式 (11) は式 (17) および式 (18) に変換することができる。

$$\frac{\partial C_{sc,i,j}}{\partial t} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc,i,j+1} - C_{sc,i,j}) \quad (15)$$

$$\frac{\partial^2 C_{sc,i,j}}{\partial x^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc,i-1,j} - 2C_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j}) \quad (16)$$

$$\frac{\partial C_{ved,i,j}}{\partial t} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (17)$$

$$\frac{\partial^2 C_{ved,i,j}}{\partial x^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (18)$$

ここで、 C_{ij} は皮膚における i 番目の位置の j 番目の時間の濃度を表す。なお、 Δx は $x_{i+1}-x_i$ を表し、 Δt は $t_{j+1}-t_j$ を表す。式 (15) および式 (16) を式 (10) に、式 (17) および式 (18) は式 (11) に代入すると次式が得られる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc,i-1,j} + (1-2rD_{sc})C_{sc,i,j} + rD_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j} \quad (19)$$

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved}D_{ved,i-1,j} + (1-2rD_{ved})C_{ved,i,j} + rD_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j} \quad (20)$$

ここで、 r は $\Delta t/\Delta x^2$ を示す。

差分法を用いると、式 (13) は式 (21) に、式 (14) は式 (22) で表すことができる。

$$Flux_j = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (21)$$

$$Q = Q_{j-1} + Flux_j \Delta t \quad (22)$$

ここで、 n は皮膚の分割数を示す。各パラメータは表計算ソフト Microsoft® Excel を用いて計算した。なお、今回は $n=10$ とした。Full-thickness pig ear skin 中の各パラメータは累積透過量 Q の実測値を非線形最小二乗法を用いてカーブフィッティングすることで算出した。その際、はじめに stripped skin の透過挙動から拡散係数 D_{ved} および分配係数 K_{ved} を求め、 D_{ved} 、 K_{ved} および full-thickness skin の透過挙動から算出した。計算では $D_s \cdot \Delta t/\Delta x^2$ が 0.5 以下になるように Δt および Δx を設定した。

第2節 実験方法

2.1. 試薬

Lidocaine hydrochloride monohydrate (LC) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。Nicotinic acid (NA) は東京化成工業株式会社（東京、日本）から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級品を用いた。これらの試薬は精製せずにそのまま用いた。

2.2. 実験動物

三元豚の耳（ブタ耳）は株式会社埼玉実験動物供給所（埼玉、日本）から食用のブタ耳を購入した。

2.3. 皮膚摘出および前処理法

自然解凍したブタ耳は、表面を傷つけないように丁寧に水洗いし、水分を良く拭き取った。角層除去皮膚の場合には、セロハンテープを用いて角層側に 50 回テープストリッピングを行い、角層を完全に除去した。各皮膚サンプルについてメスを用いて必要面積部分を摘出した。

2.4. LC の皮膚中濃度定量のための検量線用のブタ皮膚の調製法

摘出した stripped pig ear skin を適当な大きさに切り分け、種々濃度 (100、500、1000、1500、2500 $\mu\text{g/mL}$) に調製した LC 溶液中に、完全に浸かるように入れた。

また、コントロールとして、stripped pig ear skin 片を PBS 中に同様に完全に浸かるように入れた。24 時間静置後、すべての皮膚片を取り出し、凍結包埋剤（OTC コンパウンド、Super Cryoembedding Medium、株式会社 Section-Lab、広島、日本）を用いて垂直切片が得られるように皮膚を立てた状態で包埋し、-20℃ イソペンタン中で速やかに凍結させた。

2. 5. 薬物の *in vitro* 皮膚透過試験法

2. 5. 1. LC の *in vitro* 皮膚透過試験法

方法 2. 3. で調製した角層を有する full-thickness pig ear skin および角層を除去した stripped pig ear skin は、表皮側を上向きにして縦型拡散セル（有効透過面積 1.77 cm^2 ）にセットした。その後、角層を水和するため、表皮側に 1.0 mL、真皮側に 6.0 mL の PBS を適用し、1 時間放置した。次に、角層側から PBS を回収し、真皮側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を真皮側に補充した。また、角層側には PBS に溶解させた 2.5 mg/mL LC 溶液を 1.0 mL 適用し、8 時間（full-thickness pig ear skin）および 4 時間（stripped pig ear skin）の透過試験をそれぞれ行った。実験中、セル内の温度は 32 °C に保ち、真皮側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで常時攪拌した。経時的に真皮側から 0.5 mL サンプリングを行い、その都度、同量の PBS を補充した。透過試験より得られた LC のサンプル溶液は遠心分離（18,800×g、5 min、4 °C）し、その上清 200 μL と同量のアセトニトリルと混和後遠心分離（18,800×g、5 min、4 °C）することでタンパク質を除去し、HPLC にて測定した。HPLC システムは、LC-10AD ポンプ、SIL-20A オートインジェクター、SPD-10AV 紫外・可視吸光

度検出器、CTO-10AC カラムオーブン（株式会社島津製作所、京都、日本）から構成され、カラムは Inertsil®ODS-3 4.6mm×150 mm（GL Sciences Inc.、東京、日本）を用いて、カラム温度は 40°C とした。移動相は 5 mM sodium 1-heptanesulfonate を含有した 0.1% phosphoric acid : acetonitrile=7 : 3 を用い、流速 1.0 mL/min とした。また、injection volume は 10 µL とし、検出波長 UV230 nm でピーク面積を測定した。

2. 5. 2. NA の *in vitro* 皮膚透過試験法

方法 2.3. で調製した角層を有する full-thickness pig ear skin を電動ダーマトーム（Acculan 3Ti Dermatome、Aesculap-a B.Braun Company、Melsungen、Hessen、Germany）を用いて表皮側より下層に向けて厚さが約 1000 µm となるように皮膚の厚みを調製し⁶⁰⁾、横型拡散セル（有効透過面積 0.95 cm²）にセットした。角層を水和するため、表皮側および真皮側に 3.0 mL の超純水を適用し、1 時間放置した。その後、表皮側から超純水を回収し、超純水に溶解させた飽和溶解度付近の NA（19 mg/mL）溶液を 3.0 mL 適用し、12 時間の透過試験を行った。実験中、セル内の温度は 32 °C に保ち、表皮側および真皮側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで常時攪拌した。

2. 6. NA および LC 皮膚透過試験後の皮膚処理法

透過試験終了後にドナーおよびレシーバー溶液を除去して full-thickness/stripped pig ear skin を回収し、表皮側および真皮側に LC 適用時には pH 7.4 の PBS、NA 適用時には超純水を用いて皮膚表面に残存している薬物を除

去した。その後、皮膚を切断し、凍結包埋剤（2% CMC コンパウンド）を用いて包埋し、-20°C イソペンタン中で速やかに凍結させた。クライオスタットを用いて皮膚に対し垂直方向に厚み 7-10 μm の皮膚組織切片を作製した。このとき、スライドガラスはインジウムスズ酸化物でコーティングされた ITO スライドガラスを用いた。作製した皮膚組織切片をシリカゲル条件下で 1 時間乾燥させた後、ポジティブイオンモードで MALDI イメージング質量分析を行うために 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を用いてマトリックス処理を行った。DHB はノズル口径が 0.2 mm のエアブラシを用いて塗布した。マトリックス処理後、iMScope を用いて観察および測定を行った。なお、iMScope の条件は、飛行モードを反射モード、検出モードをポジティブイオンモード、測定範囲を荷電質量比 200-900 m/z (LC)、100-400 m/z (NA)、レーザーショット数を 50 shots/pix、空間分解能を LC が 10 μm 、NA が 5 μm で行った。

2. 7. LC の BioMap®解析と輝度解析法

iMScope 観察および測定から得られた LC の固有シグナル強度 (m/z 235.18) を MS イメージングソフトである BioMap®(Novartis Pharma K.K., Kanton, Basel, Switzerland) を用いて画像化した。その後、画像処理ソフトウェアである Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.) を用いて皮膚深度方向に対し、一定面積の輝度の平均値を算出した。皮膚組織切片画像を角層側 ($x = 0$) から 5 層に領域を分け、各層の輝度強度を測定した。Figure 12 にその分画例を示す。自家輝度強度の平均値を各深度から得られた輝度強度から差し引き、各深度の蛍光強度とした。

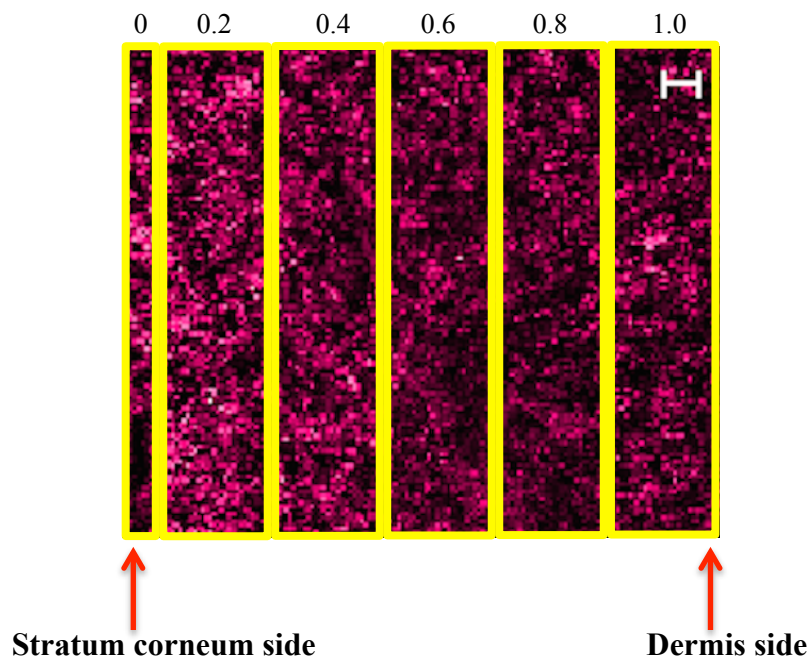


Fig. 12 Example of an IMS observation image for NA intensity in full-thickness pig ear skin section after the *in vitro* skin permeation experiment.

2. 8. NA の BioMap[®]解析および Image J software による輝度解析法

iMScope 観察および測定から得られた皮膚組織切片の表皮・真皮中に含まれる NA の固有シグナル強度 ($[M+H]^+$: m/z 124.04、 $[M+Na]^+$: m/z 146.02、 $[M+K]^+$: m/z 161.99) を MS イメージングソフトである BioMap[®] を用いて画像化した。その後、画像処理ソフトウェアである Image J ソフトウェアを用いて皮膚深度方向に対し、一定面積の輝度の平均値を算出した。なお、より詳細に皮内各深度での NA 分布を調べるため、NA の解析カラムを角層側から LC の場合より多い 16 層に分けた。Figure 13 に測定部位 (面積) のとり方を示す。

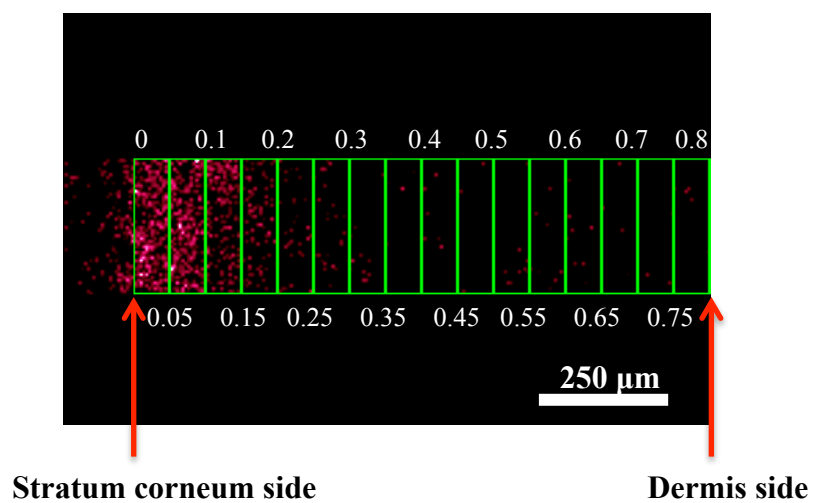


Fig. 13 Example of an IMS observation image for NA intensity in full-thickness pig ear skin section after the permeation experiment.

第3節 結果

3.1. 種々濃度 LC 溶液に浸したブタ耳皮膚切片観察

Figure 14 に種々濃度 LC 溶液に浸した stripped pig ear skin 組織切片の iMScope 観察結果を示す。Fig. 14a はコントロール (0 μM の LC 適用時) である。浸した LC 濃度が高くなるに連れ (Fig. 14b→f)、得られる画像中の輝度強度が高くなった。

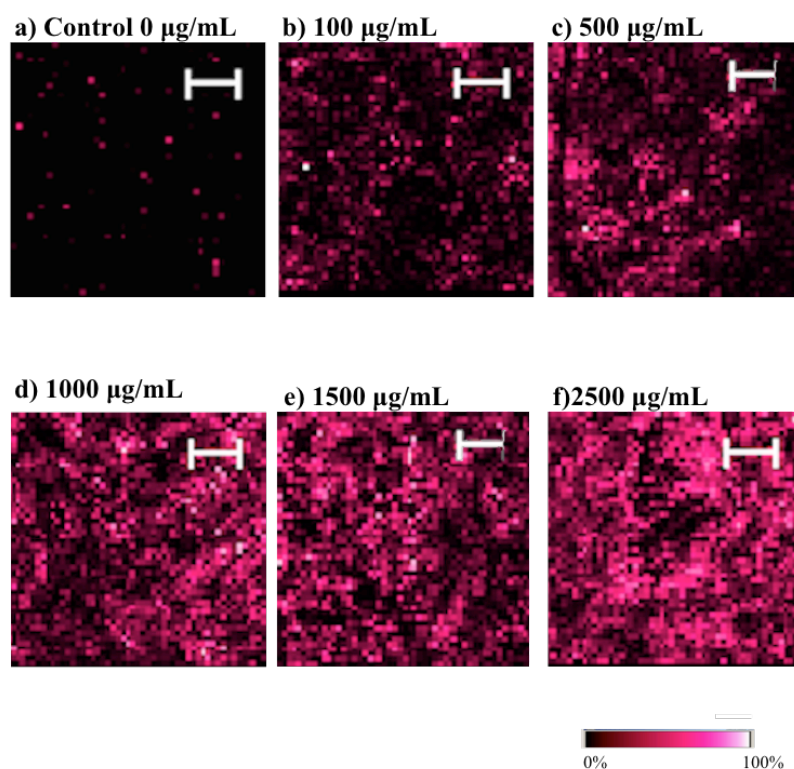


Fig. 14 iMScope images for LC brightness intensity in stripped pig ear skin after immersions in solutions with different concentrations of LC.

a) 0 $\mu\text{g/mL}$, b) 100 $\mu\text{g/mL}$, c) 500 $\mu\text{g/mL}$, d) 1000 $\mu\text{g/mL}$, e) 1500 $\mu\text{g/mL}$, f) 2500 $\mu\text{g/mL}$.

3. 2. 皮膚組織切片中 LC の質量顕微鏡を用いた検量線

Figure 15 に Fig. 14 に示した画像から得られた stripped pig ear skin の LC に起因する輝度強度の平均値を仕込み濃度に対してプロットした検量線を示す。この検量線から明らかなように、画像から得られた輝度強度と種々 LC 仕込み濃度の関係において高い決定係数 ($R^2=0.98559$) が得られた。

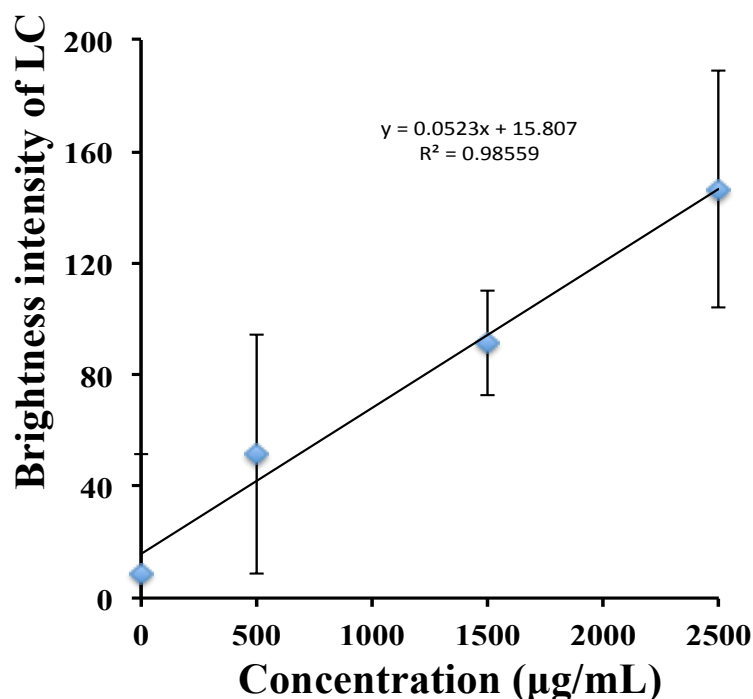


Fig. 15 Relationship between LC brightness intensity observed by iMScope and the concentration of LC applied. Each point shows the mean \pm S.D. (n = 5).

3. 3. LC の IMS 分析および Image J ソフトウェアによる画像解析

透過試験終了後の皮膚組織切片を iMScope にて観察し、得られた画像から皮膚中の輝度強度を Image J ソフトウェア測定した。Figure 16a に透過試験終了後 full-thickness pig ear skin の定常状態時の組織切片の画像を示す。Fig. 16b, c に

stripped pig ear skin の定常状態時の皮膚組織切片の画像を示す。LC を適用した皮膚表面付近の輝度強度が著しく高く、また、レーザー側表面の輝度強度が安定しないため、前編の CLSM を用いた画像解析結果と同様に、本検討でも両表面付近の輝度強度については定量化しなかった。Full-thickness pig ear skin および stripped pig ear skin とともに LC 適用部位表面から真皮に向かって、薬物の存在を表す赤いドットの密度が減少すること、すなわち LC の濃度勾配の存在を確認することができた。

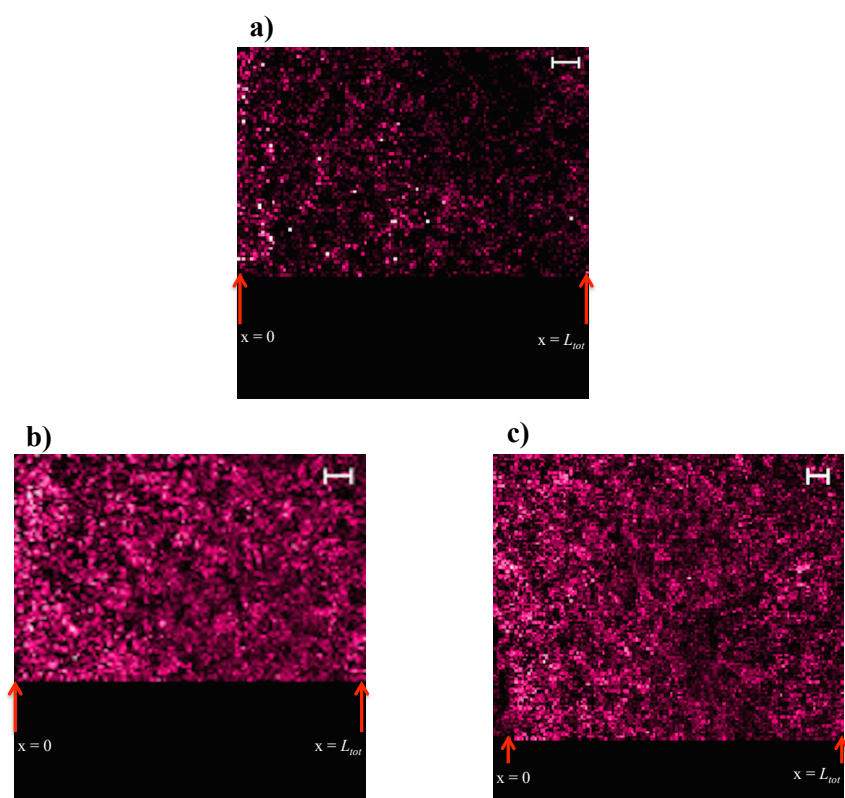


Fig. 16 IMScope images of LC brightness intensity in full-thickness/stripped pig ear skin in the steady state after the permeation experiment. a) correspond to full-thickness skin, b) and c) correspond to stripped skin, respectively.

3. 4. LC の皮膚透過プロファイルおよび差分解析

Figure 17a に full-thickness pig ear skin に 2.5 mg/mL LC 溶液を適用した後の *in vitro* 皮膚透過プロファイルを示す。また、Fig. 17b に stripped pig ear skin に 2.5 mg/mL LC 溶液を適用した後の *in vitro* 皮膚透過プロファイルを示す。いずれも典型的な累積皮膚透過挙動が得られたため、full-thickness pig ear skin の透過プロファイルより K_{sc} 、 D_{sc} を、stripped pig ear skin の透過プロファイルより K_{ved} 、 D_{ved} をそれぞれ算出した。結果を Table 2 に示す。それらのデータを用いて第 1 節に示した解析法にて定常状態時における concentration-distance profile を求めた。その計算結果を破線で実験終了時の iMScope を用いた実測値とともに Fig. 18 に示す。拡散モデルに基づく計算値において、full-thickness skin では、角層中濃度の濃度勾配（傾き）は生きた表皮・真皮中濃度の濃度勾配より大きく、生きた表皮から真皮下部へ皮膚深度が深くなるにつれて皮膚中濃度が直線的に減少することが示された。しかし、CLSM による実測値では明確な 2 相性はしめされず、生きた表皮・真皮中の濃度は計算値より高かった。一方、stripped pig ear skin ではどちらの値も、生きた表皮から真皮下部へ皮膚深度が深くなるにつれて皮膚中濃度が直線的に減少したが、その勾配が完全に一致しなかった。CLSM では皮膚表面近くの値を数値化していないため、角層中の濃度評価が出来ていないことが、2 相性が観察されない理由と考えられる。生きた表皮中での濃度やその勾配の違いは、CLSM では拡散に寄与しない結合状態にある薬物も測定されていること、stripped skin を用いる方法では、 K_{ved} の値などが正確に求められないことがその原因として考えられる。

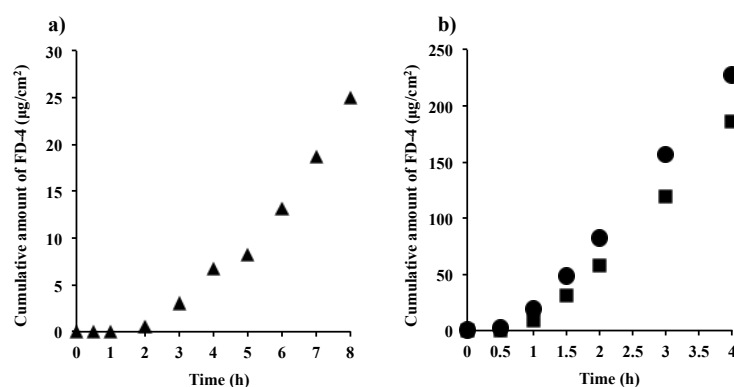


Fig. 17 Time course of the cumulative amount of LC that permeated through full-thickness/stripped pig ear skin.

Symbols: ▲: full-thickness skin, ●: stripped skin, ■: stripped skin.

Table 2 Permeation parameters of LD through pig ear skin

Drug		Parameters	
LC	D_{sc}	(cm ² /h)	1.81×10^{-6}
	D_{ved}	(cm ² /h)	1.29×10^{-3}
	K_{sc}	(-)	3.73
	K_{ved}	(-)	3.83

D_{sc} : Stratum corneum diffusion coefficient

D_{ved} : Viable epidermis and dermis diffusion coefficient

K_{sc} : Stratum corneum partition coefficient

K_{ved} : Viable epidermis and dermis partition coefficient

Thickness of skin: 1485 µm

Thickness of stratum corneum: 15 µm

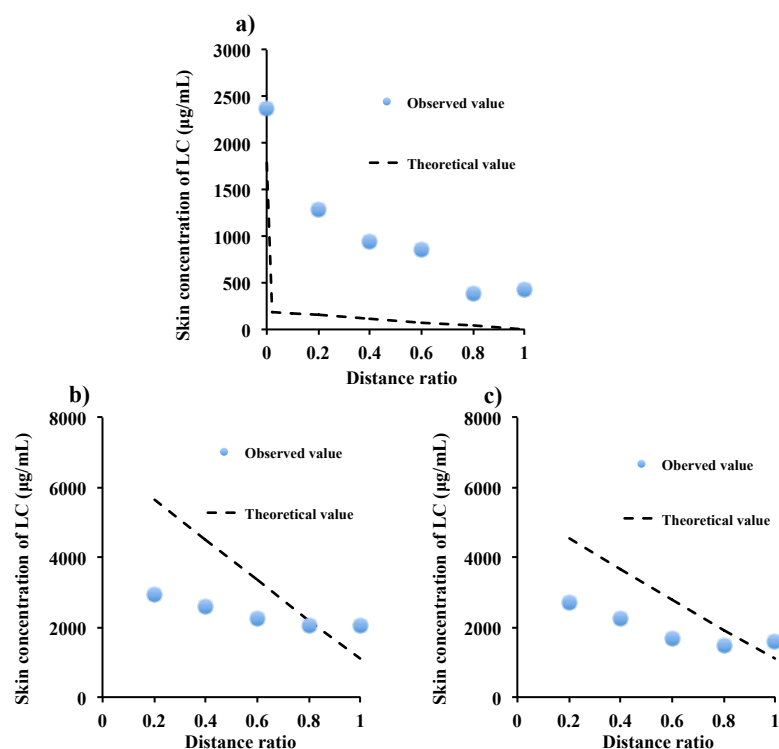


Fig. 18 Concentration-distance profile of LC in the steady state.

Symbols (○): Observed values from image analysis, Dashed line: Calculated value by the difference equation based on Fick's law of diffusion from the skin permeation profile. a) correspond to full-thickness skin, b) and c) correspond to stripped skin, respectively.

3. 5. IMS を用いた NA 固有シグナル解析

Figure 19 に、iMScope 観察および測定から得られた皮膚組織切片の表皮・真皮中に含まれる NA の固有シグナルの一例を示す。[M+H⁺] (m/z 124.04) のシグナルは皮膚組織切片中の水素イオン付加により生じたものに対応する (Fig. 19a)。

[M+H⁺]シグナルは、他のイオン付加 NA シグナルである[M+Na⁺] (m/z 146.02) (Fig. 19c) および[M+K⁺] (m/z 161.99) (Fig. 19b) と比べシグナル強度が高かった。ナトリウムイオンの付加による [M+Na⁺] シグナルは極めて弱くほとんど検出されなかったが (Fig. 19c)、カリウムイオンの付加による[M+K⁺]のシグナルは良く検出された (Fig. 19b)。すなわち、IMS より得られた NA 固有シグナルの分析は、皮膚組織切片中の NA 分布を各イオンの付加状態を含めて分析できる有用な方法と考えられた。

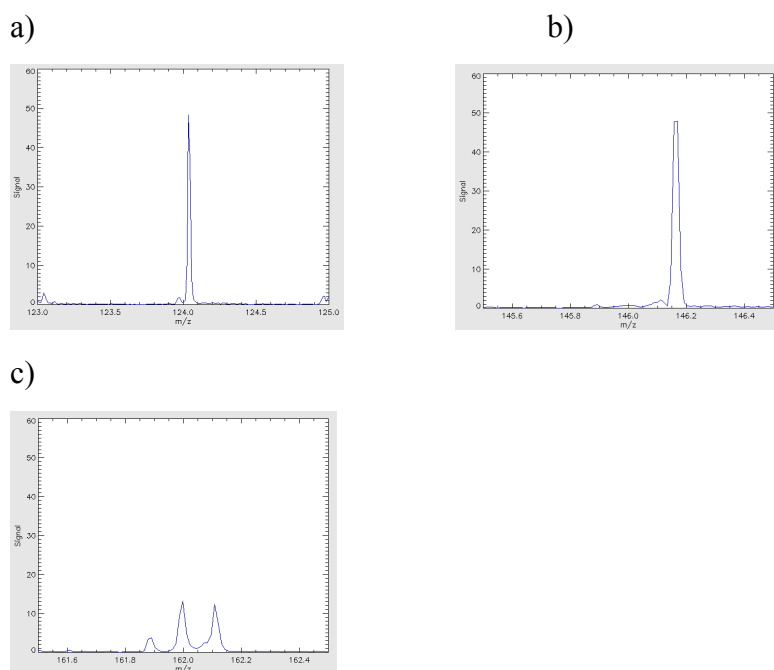


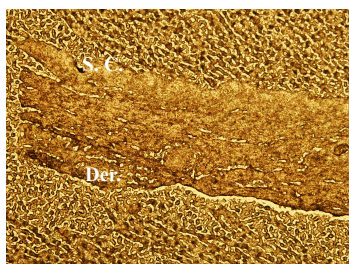
Fig. 19 Measurement intensity of nicotinic acid in mass microscope. a) [M+H⁺], b) [M+K⁺] and c) [M+Na⁺]

3. 6. NA のイメージング質量分析

Figure 20 に NA を皮膚に適用しなかった場合 (Fig. 20a) とした場合 (Fig. 20b) の皮膚組織切片の光学画像を示す。光学画像観察では両方の組織切片の間に違

いが認められなかった。また、Fig. 20b の白枠部の内側を iMScope にて測定し、得られた結果を BioMap®にて画像化した皮内 NA 分布画像を Figure 21 に示す。なお、各 NA の皮内分布は画像内の赤いスポットで示した。BioMap®画像観察より $[M+H]^+$ のシグナル分布が一番多く確認でき (Fig. 21a)、 $[M+Na]^+$ ではほとんど確認できず (Fig. 21c)、また、 $[M+K]^+$ では $[M+H]^+$ に比べると弱いシグナルの分布が確認できた (Fig. 21b)。Figures 20 と 21 で示した結果より、本分析方法は、NA の皮内深さ方向の分布を各イオン対の形成に関する情報を含めて分析することができる有用な方法と考えられた。

a) Without NA



b) With NA

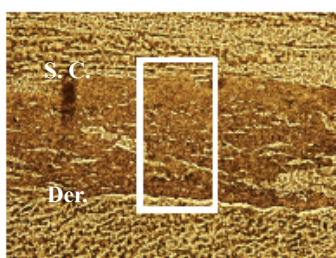


Fig. 20 Light micrograph of full-thickness pig ear skin sections.

a) Non-applied skin, b) NA applied skin. The designated square shows the observation area with mass spectrometry. Abbreviations; S.C.; stratum corneum, Der.; dermis. Each pixel was 10 μm width.

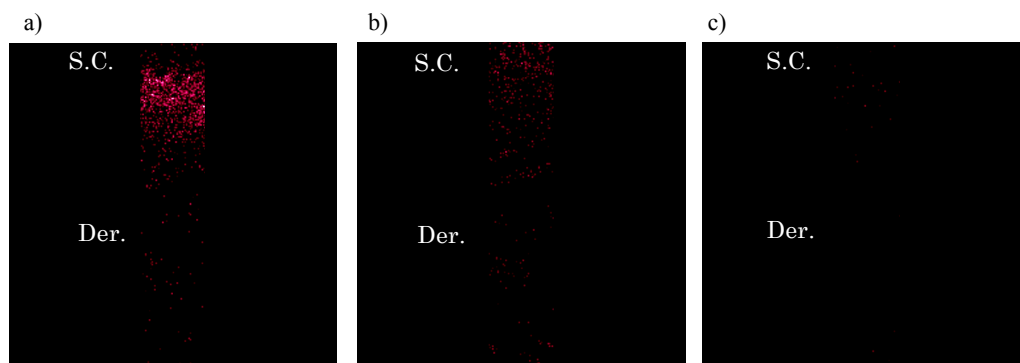


Fig. 21 An imaging processing software, Biomap, was used to analyze the disposition of NA combined with H^+ (a), K^+ (b), and Na^+ (c) in the full-thickness pig ear skin. NA distribution was marked with a red spot. Abbreviations; the same as in Fig. 20.

3. 7. Image J ソフトウェアによる輝度解析

皮膚組織切片の NA の各深度分布は Image J ソフトウェアによって数値化した。Figure 22 a-c に輝度解析の結果を示す。シグナルが一番強かった $[M+H^+]$ では、非線形の挙動が観察された (Fig. 22a)。また、 $[M+K^+]$ では、 $[M+H^+]$ に比べると輝度が低いものの、こちらからも非線形様の挙動が観察された (Fig. 22b)。しかし、 $[M+Na^+]$ では僅かに輝度が確認できた程度であった (Fig. 22c)。さらに、 $[M+H^+]$ 、 $[M+Na^+]$ 、 $[M+K^+]$ を合わせると (Fig. 22d)、LC とは異なったパターンで表皮中に NA およびその塩が分布していることがわかった。

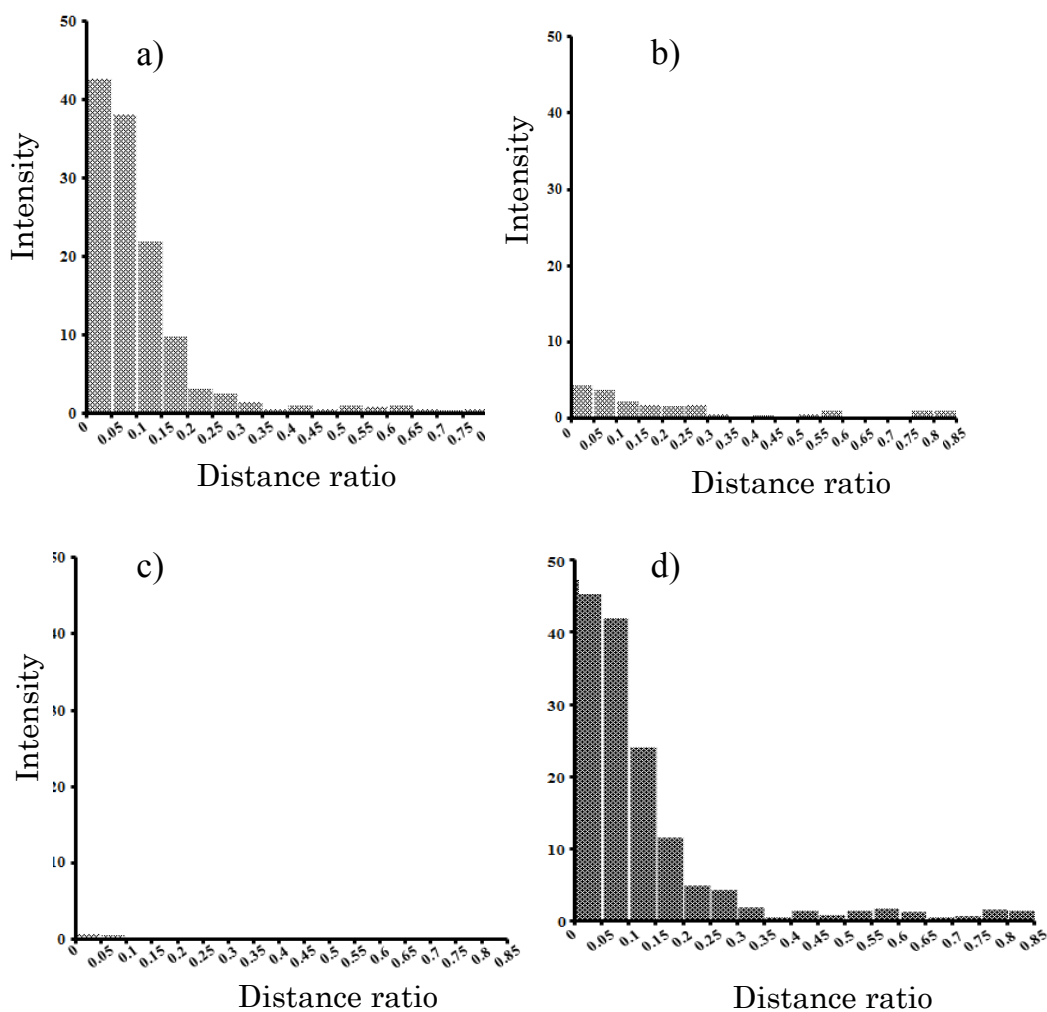


Fig. 22 The NA distribution quantified in the full-thickness pig ear skin using brightness analysis with Image J. NA intensity in the skin combined with H^+ (a), K^+ (b), and Na^+ (c), and total of all $[M+H^+]$, $[M+K^+]$, and $[M+Na^+]$ signals (d).

第 4 節 考察

iMScope を用いて IMS 法によって、皮膚組織切片の各深度での薬物分布を確認でき、薬物皮内動態の画像解析に用いることが出来ると考えられた。すなわち、iMScope 各画像の Image J ソフトウェア解析より得られた輝度強度と皮膚を浸した溶液中の LC 濃度に直線関係が認められ (Fig. 15)、iMScope を用いることにより、非蛍光標識薬物の皮膚中濃度の定量的評価が可能と考えられた。透過実験終了後の定常状態時における full-thickness pig ear skin および stripped pig ear skin の iMScope を用いた画像解析では、得られた皮膚中 concentration-distance profile 観測値が拡散モデルでの計算値と同様な傾向は見られたものの一致するものではなかった。現時点でどちらの方法がより正確であるか結論を出せないが、iMScope を用いることで、皮膚組織の各部位における薬物の存在を直接に評価できたと考えられた。拡散モデルは、拡散移動可能な分子の存在のみを予測するのに対して、iMScope の場合は薬物の存在そのものを評価しており、数値の正確さなどで改善の必要があるかもしれないが、より重要で有用な情報を含んでいるものと期待できる。これらの点については、更なる検討が必要である。しかし、Fig. 16 にみられるように角層および真皮のレーザーとの接触表面での輝度強度が著しく高くなる傾向が見られ、角層中の薬物濃度の評価が困難であった。この点については、他の方法との組み合わせを含めて改善が必要である。また、もう 1 つの問題点として操作における時間のずれが考えられる。MS 測定を行う前に切片に付着する余分な水分をシリカゲル条件下で 1 時間乾燥させたことや DHB 塗布によるマトリックス処理などの前処理によって生じたタイ

ムラグが結果に影響したと考えられた。今後より正確に薬物の皮膚中各深度濃度を評価するには、測定条件だけでなく、根本的に機器の精度の向上を待つ必要もあると考えられた。

NA を用いた検討では、iMScope を用いることで薬物のイオン付加の状態を含めて NA の組織内分布の評価が可能であることが示された。このことは、iMScope を用いた IMS 法固有の利点であり、大変有用な情報が得られると考えられた。

以上のことより、IMS 法を用いた薬物の組織内分布評価法は、従来の測定法のように生体組織を破碎したり、薬物を抽出したりすることにより測定する手法より簡便に薬物の組織内での詳細な濃度分布を調べられる有用な方法と考えられた。さらに、数学的予測法では評価できないイオン対の形成に関する情報を含めた詳細な薬物分布を直接的に評価できることから、幅広い応用が期待できる。

第5節 小括

iMScope を用いた IMS 法は、皮膚局所に適用された薬物の皮膚中各深度分布をそのイオン対形成の状態を含めて評価することができる評価法である。したがって、本法は、皮膚に適用された薬物の有効性・安全性を評価する新規方法として有用であると考えられる。本法は、前章で示した蛍光試薬や放射性標識薬物を使用することがなく、幅広い物理化学的性質の非蛍光標識薬物の組織内分布を知ることができる。しかし、先述したように測定手法の最適化や機器自体の機能や精度の向上が現時点で必要であることも事実であり、それがなされれば、より正確に薬物の組織内分布を評価でき、有用性が更に高まると考えられた。

第 3 章 ピエゾ感圧アプリーケーター (Nano-dose applicator)

により投与された蛍光標識薬物の種々微小组織中の分布評価に関する検討

近年、ナノテクノロジーの急速な発展により、様々な機能を有した微粒子運搬体や医療機器の開発が可能となり、それらを用いた標的組織治療技術が注目されている^{68, 69)}。高いターゲッティング効率や治療効果を求めるには、病変部のみに選択的に薬物を送達する技術が必要であるが、従来の DDS による薬物送達は、標的部位に一定量の薬物を送達することができるものの、多くの薬物は標的部位へ到達するまでに正常な組織にも分布する欠点があり、これらが重篤な副作用を引き起こす可能性がある。そこで、副作用を抑え、かつ最大限の治療効果を得るために、最少量の薬物を標的部位である病巣組織へ直接的にかつ効率的に送達する方法が有効であると考えられる。また、その開発には病巣組織局所に移行した薬物の安全性・有効性の評価、すなわち、標的部位での薬物動態を知ることが必要である⁷⁰⁻⁷²⁾。

第 1 章、第 2 章では、薬物の組織（モデル組織：皮膚）内分布を直接的に評価できる CLSM や iMScope を用いた画像解析手法の有用性について検討した。CLSM を用いた方法は、用いることができる薬物に制限があるものの、薬物の組織中各深度濃度評価は簡便かつ正確である。そこで、本章では、組織内に送達された微量薬物の 3 次元方向に広がる組織内分布を CLSM による画像解析法にて評価した。微量薬液投与には、ピコ～ナノリットルの吐出量を正確に

制御出来る Nano-dose applicator をデバイスとして選択した。生体組織への適用に先立ち、寒天膜をモデル膜として予備的検討を行った。また、摘出ブタ耳皮膚をモデル組織として、Nano-dose applicator を用いて皮膚表面の角層部分および毛嚢開口部にそれぞれ微量薬液を適用し、CLSM を用いて薬物の組織内分布を観察した。これらに用いるモデル薬物は第 1 章と同様 FD-4 とした。

また、皮膚を介したイオン形薬物および高分子薬物の皮膚透過性を改善する方法として電流を皮膚に負荷するイオントフォレーシスが知られている。そこで本研究では、Calcein disodium (Cal) をモデル薬物として、微弱な定電流 (CEC: constant electric current) 負荷に着目し、皮膚に CEC 併用により適用された薬物の分布を CLSM にて評価した。

さらに、これまでの検討には摘出皮膚を用いてきたが、摘出した脳や肝臓についても、Nano-dose applicator による微量薬物の low dose application を行い、新規 Accurate Dosed Drug Delivery System (adDDS) の開発の可能性についても考察した。

第 1 節 実験方法

1.1. 試薬

Fluorescein isothiocyanate-dextran (4 kDa; FD-4) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。Calcein disodium (Cal) は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。寒天末は関東化学株式会社 (東京、日本) から購入した。寒天ゲル膜作製用鋳型として用いたシリコーンゴムシートはタイガースポリマー株式会社 (東京、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級または HPLC 用を用いた。これらの試薬は精製せずにそのまま使用した。

1.2. 実験動物

三元豚の耳 (ブタ耳) は株式会社埼玉実験動物供給所 (埼玉、日本) から食用のブタ耳を購入した。WBN/11a-Ht 系雄性ヘアレスラット (体重 220-260 g) は城西大学生命科学研究センター (埼玉、日本) または石川実験動物 (埼玉、日本) から購入した。なお、動物の飼育および実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾 (H24002) を得た後、城西大学動物実験規定に従い行った。

1.3. 寒天膜の鋳型の作製法

モデル組織として用いた寒天膜は、膜強度が低く縦型拡散セル（後述）に直接セットすることが困難であったため、直径 25 mm の穴を開けた厚みが 1 mm のシリコーンゴムシートを寒天膜の鋳型として用いて調製した。

また、一辺 30 もしくは 100 mm の正方形の穴を開けた厚み 1 mm のシリコーンゴムシートを蛍光マーカーの寒天膜表面分布観察するための鋳型として用いた。

1.4. 4%寒天膜の調製法

透過実験用の 4%寒天膜を作るために、寒天粉末 0.4 g に pH7.4 リン酸緩衝液（PBS）を加え、全量を 10mL とした。その後、ホットプレートスターラー（ESH-1DR、アズワン株式会社、大阪、日本）にて加熱攪拌（97°C、180 rpm）した。1.3.に示した鋳型に溶解した 4%寒天溶液を流し、上下から穴を開けていないシリコーンゴムシートで挟み、4°Cに設定された冷蔵庫で 15 分放置した。その後、上下のシリコーンゴムシートを取り外し、各実験用の寒天膜とした。

1.5. FD-4 の 4%寒天膜透過実験法

Nano-dose applicator（クラスターテクノロジー株式会社、東京、日本）もしくはディスペンサーは Eppendorf Reference[®]（エッペンドルフ株式会社、東京、日本）を適用に用いた。調製された透過実験用寒天膜を縦型拡散セル（有効透過面積 3.14 cm²）にセットした。その後、レシーバー側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS をレシーバー側に補充した。また、ドナー側には PBS に

溶解させた 5 mM FD-4 溶液を Nano-dose applicator (0.1 μ L) またはディスペンサー (1、10、100、1000 μ L) を用いて膜表面から 2 cm に固定した状態から適用し、20 分の透過試験を行った。実験中、セル内の温度は 32 $^{\circ}$ C に保ち、レシーバー側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで常時攪拌した。経時的にレシーバー側から 0.5 mL サンプルングを行い、その都度、同量の PBS を補充した。なお、Nano-dose applicator の吐出条件は、電圧 7.00 V、繰り返し周波数 (1 秒あたりの吐出回数) 10000 Hz、吐出回数 10000 回である。なお、吐出量はトータル 0.10 μ L に設定した。なお、これらパラメーターは Wavebuilder[®] (クラスターテクノロジー株式会社) を用いて設定した。

1. 6. FD-4 定量法

透過試験より得られた FD-4 のサンプル溶液は遠心分離 (18,800 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) し、その上清 300 μ L を蛍光分光光度計にて、励起波長 480 nm、蛍光波長 520 nm の条件で測定した。

1. 7. FD-4 の寒天膜表面分布への適用液量の影響の測定方法

Nano-dose applicator もしくはディスペンサーを調製した寒天膜表面の真上にセットし、膜表面との距離を 2 cm とした。その後、Nano-dose applicator (0.1 μ L) およびディスペンサー (1、10、100、1000 μ L) を用いて 5 mM FD-4 溶液を寒天膜表面に適用した。薬液の寒天膜表面分布の変化を経時的に調べるため、適用した直後、10 分および 30 分後にそれぞれの寒天膜を均等にメスにて 25 個の正方形のブロックに切り分け、PBS 1.0 mL に 90 分浸すことにより寒天膜中の FD-4

を抽出した。抽出液中 FD-4 は蛍光分光光度計を用いて測定した。得られた各ブロック中の FD-4 濃度を SigmaPlot (SigmaPlot 13、株式会社ヒューリンクス、東京、日本) にて 2D 空間に距離比を取った等高線図としてプロットした。なお、適用液量が 0.1、1、10 μL の場合は一辺 30 mm の正方形内の FD-4 濃度分布を評価し、適用液量が 100 および 1000 μL の場合は一辺 100 mm の正方形内の FD-4 濃度分布を評価した。

1. 8. 薬物分布半径変化率の算出

寒天膜表面に適用された薬液の表面分布変化を調べるため、薬液の表面分布画像から Image J ソフトウェアを用いて経時的な変化を数値化した。得られた濃度分布図から薬物分布半径 ($r_{s \text{ each min}}$) を Image J ソフトウェアデータより求め、その変化率 (CR) を式 (23) より計算した。ここで $r_{s 0 \text{ min}}$ は、薬液適用直後の膜表面での分布半径である。

$$\text{CR} = r_{s \text{ each min}} / r_{s 0 \text{ min}} \quad (23)$$

1. 9. ブタ耳皮膚、ヘアレスラット脳およびヘアレスラット肝臓の摘出方法

自然解凍したブタ耳は表面を傷つけないよう丁寧に水洗いし、水分を良く拭き取った後、メスを用いて必要面積を摘出し、真皮側の脂肪をハサミで丁寧に取り除いた。また stripped pig ear skin はセロハンテープを用いて角層側に 50 回テープストリッピングを行い、角層を完全に除去した。

摘出ヘアレスラットの脳および肝臓は、ペントバルビタール麻酔下のヘアレスラットの胸部をハサミで切開し、注射針を左心室に挿入し、送液ポンプ（定量送液ポンプ、東京理科機器株式会社、東京、日本）の速度を遅くして、生理食塩水を流した。その後、右心耳に小さな切開を入れ、血液が出でくるのを確認した後に送液ポンプの速度を速め、心肺灌流処理を行った。心肺灌流による脱血処理後、メスおよびハサミを用いて脳および肝臓を傷つけないよう丁寧に取り出した。その後、PBS を用いて各組織の表面を傷つけないように丁寧に洗い、水分を良く拭き取り、摘出ヘアレスラット脳および肝臓として使用した。

1. 10. 検量線用のブタ耳皮膚、脳および肝臓の調製法

摘出された full-thickness skin、stripped pig ear skin、脳および肝臓を適当な大きさに切り分け、Table 3 に示した種々濃度に調製した FD-4 または Cal 溶液、もしくはそれらを含まない溶液中に、完全に浸かるように入れた。溶媒として、FD-4 の場合 PBS を、Cal の場合 1mM EDTA-2 Na 添加 PBS を用いた。24 時間静置後、すべての組織片を取り出し、凍結包埋剤（OTC コンパウンド、Super Cryoembedding Medium、株式会社 Section-Lab、広島、日本）を用いて垂直切片が得られるように皮膚を立てた状態で包埋し、-20°C イソペンタン中で速やかに凍結させた。

Table 3 Concentrations of FD-4 and Cal in various tissues used for prepering calibration curve

	Stripped skin	Brain	Liver
FD-4	10, 50, 80, 100, 200, 500, 600, 800, 1000 µg/mL	200, 320, 400, 800, 1000, 2000, 3200 µg/mL	200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 µg/mL
Cal	100, 500, 1000, 1500 µg/mL	—	—

1. 11. 皮膚、脳および肝臓組織切片の CLSM 観察手順と条件設定法

方法 1. 10. で包埋した組織片よりクライオスタット (CM3050、LEICA、Wetzler、Hessen、Germany) を用いて包埋した組織片に対して垂直方向に厚み 7-10 µm の皮膚、脳および肝臓切片を作製した。作製した各切片は CLSM を用いて蛍光を観察した。FD-4 を用いた場合の CLSM の条件は以下の通りである。Stripped pig ear skin ; Wave length を 473 nm、Scan speed は Kalman mode の 120 µs/pix、Laser power を 4 %、HV を 415 V、Gain を 1.125 x、Off set を 0 とした。毛嚢部分を含まない full-thickness pig ear skin ; Wave length を 473 nm、Scan speed は Kalman mode の 120 µs/pix、Laser power を 30 %、HV を 360 V、Gain を 1.125 x、Off set を 0 とした。毛嚢部分を含む full-thickness pig ear skin ; Wave length を 473 nm、Scan speed は 200 µs/pix、Laser power を 10 %、HV を 344 V、Gain を 5x、Off set を 30 とした。脳組織 ; Wave length を 473 nm、Scan speed は Kalman mode の 120 µs/pix、Laser power を 4.5 %、HV を 409 V、Gain を 1.125 x、Off set を 0 とした。肝臓組織 ; Wave length を 473 nm、Scan speed は Kalman mode の 120 µs/pix、Laser power を 20 %、HV を 298 V、Gain を 1.125 x、Off set を 0 とした。

また、Cal を用いた場合の CLSM の条件は以下の通りである。Full-thickness pig ear skin ; Wave length を 473 nm、Scan speed は Kalman mode の 120 $\mu\text{s}/\text{pix}$ 、Laser power を 1.5%、HV を 365 V、Gain を 1.125 x、Off set を 0 とした。

なお、観察条件が異なることから、検量線は各条件ごとに作成した。

1. 12. ブタ耳皮膚透過実験法

1. 9. の方法で調製されたブタ耳皮膚は、角層側を上向きにし、縦型拡散セル（有効透過面積 0.64 cm^2 ）にセットした。皮膚からレーザーに漏出する自家蛍光の影響の軽減のため、かつ角層を水和するため、透過試験前に表皮側に 0.5 mL、真皮側に 4.0 mL の PBS を適用し、1 時間放置した。その後、表皮側から PBS を回収し、真皮側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を真皮側に補充した。また、角層側には Nano-dose applicator を用いて PBS に溶解させた 5 mM FD-4 を $0.1\text{ }\mu\text{L}$ 皮膚表面から 2 cm 上から適用した。実験中、セル内の温度は $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ に保ち、真皮側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで常時攪拌した。経時的に真皮側から 0.35 mL サンプリングを行い、その都度、同量の PBS を補充した。

1. 13. 皮膚透過試験後の皮膚処理法

透過試験終了後にドナーおよびレーザー溶液を除去して皮膚を回収し、パスツールピペットを用いて角層側および真皮側に PBS もしくは 1 mM EDTA-2 Na 添加リン酸緩衝液 1.0 mL で 3 回ずつ処理することで皮膚を洗浄した。その後、皮膚を真皮側から角層側へ向けて垂直方向に切断し、垂直切片が得られるよう

に凍結包埋剤を用いて皮膚を立てた状態で包埋し、 -20°C イソペンタン中で速やかに凍結させ、クライオスタットを用いて皮膚に対し垂直方向に厚み $10\ \mu\text{m}$ の皮膚組織切片を作製した。作製した皮膚組織切片は CLSM を用いて観察した。なお、このときの CLSM 観察の条件は、1. 11. の条件と同様である。

1. 14. 組織切片の CLSM 画像解析法

CLSM より得られた各組織切片画像の蛍光強度を算出するため角層側($x=0$)から真皮側に深さ方向へ $1000\ \mu\text{m}$ の長さを 10 に分割した。また、水平方向には $2000\ \mu\text{m}$ の長さを 21 に分割した。そして、各領域の蛍光強度を測定した。Figure 23 に分割の例を示す。また、各溶媒を適用した皮膚切片から得られた自家蛍光強度の平均値を各部位から得られた蛍光強度から差し引き、各部位の蛍光強度とした。検量線を用いて得られた濃度の数値を SigmaPlot にて 2D 空間に等高線図としてプロットした。

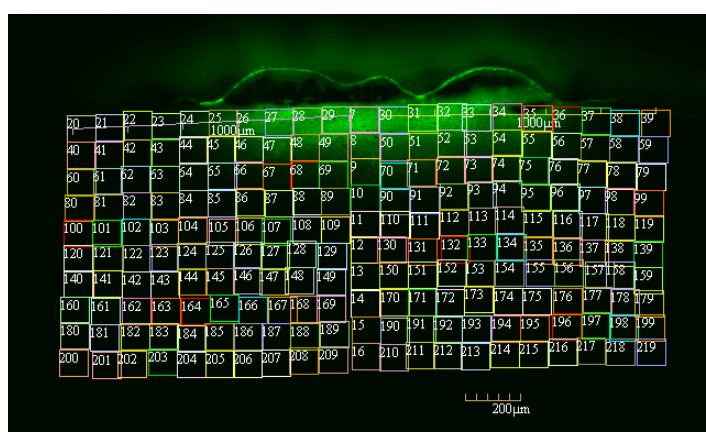


Fig. 23 Example of a CLSM observation image for the calibrating FD-4 fluorescence intensity in tissue section.

1. 15. 電極の作製法

直径 1 mm の Ag 線を 4～5 cm に切断し、それぞれ Ag 電極とした。Ag/Cl 電極は、Ag 線を 5 cm に切断後、銅板に貼り付け、3% NaCl 溶液で満たしたプラスチック容器に浸し、V-C Stabiliser (SJ-1061、アトー株式会社、東京、日本) を用いて電流を負荷することにより作製した。

1. 16. Cal のブタ耳皮膚透過実験

1. 9. の方法で調製されたブタ耳皮膚は、角層側を上向きにし、縦型拡散セル（有効透過面積 0.64 cm^2 ）にセットした。皮膚からレシーバーに漏出する自家蛍光の影響の軽減のため、かつ角層を水和するため、透過試験前に表皮側に 0.5 mL、真皮側に 4.0 mL の 1 mM EDTA-2 Na 添加 PBS を適用し、1 時間放置した。その後、表皮側から 1mM EDTA-2 Na 添加 PBS を回収し、真皮側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の 1 mM EDTA-2 Na 添加 PBS を真皮側に補充した。また、角層側には Nano-dose applicator を用いて 1mM EDTA-2 Na 添加 PBS に溶解させた 1 mM Cal 溶液を $0.1 \mu\text{L}$ を皮膚上 2 cm から適用した。実験中、セル内の温度は 32°C に保ち、真皮側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで常時攪拌した。経時的に真皮側から 0.35 mL サンプリングを行い、その都度、同量の 1mM EDTA-2 Na 添加 PBS を補充した。得られたサンプル中の Cal 濃度は蛍光分光光度計を用いて測定した。なお、Nano-dose applicator の吐出条件は、電圧 9.00 V、繰り返し周波数（1 秒あたりの吐出回数）10000 Hz、吐出回数 3000 回である。なお、吐出量はトータル $0.10 \mu\text{L}$ に設定した。なお、これらパラメーターは Wavebuilder[®]（クラスターテクノロジー株式会社）を用い

て設定した。

また、CEC 負荷は、AgCl 電極、Ag 電極をそれぞれニードル型電極とし、Ag/AgCl 電極を薬液適用直後に組織表面に適用された薬液に浸け、組織表面に電極が押し込まれないように固定し、一方、Ag 電極はレシーバー側に設置して行った (Cathodal CEC)。CEC セットアップ模式図を Fig. 24 に示す。CEC の適用条件は ADIS-HP (6.0 ver.) (ADVANCE、東京、日本) にて制御し、一定電流 (0 mA、0.01 mA、0.02 mA、0.04 mA、0.08 mA、0.16 mA) を適用した。

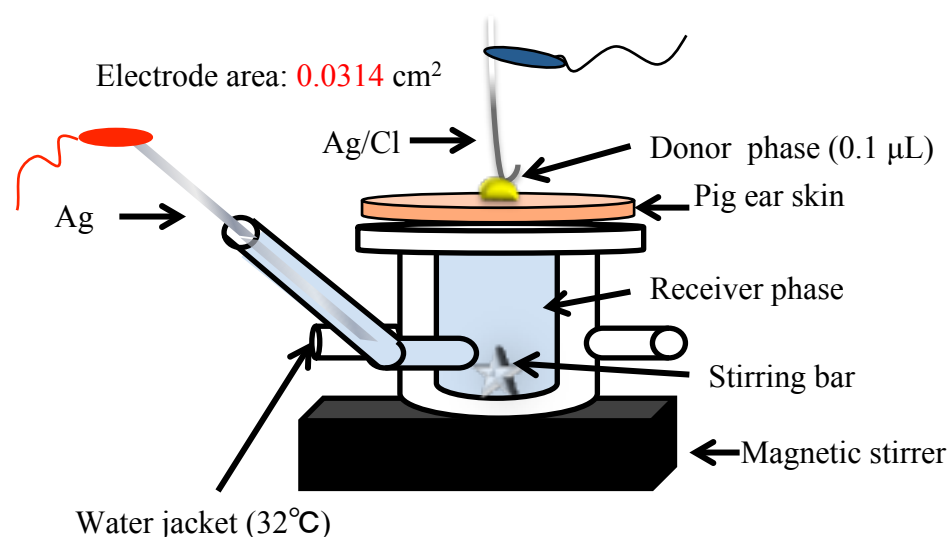


Fig. 24 Set-up of diffusion cells for pig ear skin permeation experiment

1. 17. Cal 定量法

透過試験より得られた Cal のサンプル溶液は遠心分離 (18,800×g、5 min、4 °C) し、その上清 300 μL を蛍光分光光度計にて、励起波長 485 nm、蛍光波長 515 nm の条件で測定した。

1. 18. FD-4 適用後の脳および肝臓組織観察法および画像解析法

摘出されたヘアレスラットの脳および肝臓に 0.1 μL の 5 mM FD-4 溶液を Nano-dose applicator を用いて適用した。薬物適用 30 分後に各組織を回収し、冷凍包埋剤に包埋し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ イソペンタン中で速やかに凍結させた。各組織に対して垂直方向の組織切片（厚さ 7-10 μm ）をクライオスタットにより作製した。CLSM 観察より得られた各組織切片画像の蛍光強度を 1. 14. に示した方法で解析し、各深度の濃度分布を算出した。得られた数値を SigmaPlot にて 2D 空間に等高線図としてプロットした。なお、Nano-dose applicator（クラスターテクノロジー株式会社、東京、日本）の吐出条件は、電圧 7.00 V、繰り返し周波数（1 秒あたりの吐出回数）10000 Hz、吐出回数 10000 回である。なお、吐出量はトータル 0.10 μL に設定した。なお、これらパラメーターは Wavebuilder[®]（クラスターテクノロジー株式会社）を用いて設定した。

第2節 結果

2.1. *In vitro* 4%寒天膜透過性

Figure 25 に 4%寒天膜に適用した種々適用液量の FD-4 の *in vitro* 4%寒天膜累積透過プロファイルを示す。各適用液量では、典型的な薬物の膜累積透過挙動を示したが、適用液量が 0.1、1、10 μL と少ない場合は lag time 後の透過速度が経時的に低下して行くことも確認できた (Fig. 26c-e)。これはドナー側の FD-4 量の減少が適用された溶液に含まれる FD-4 の総量に対して大きいため、皮膚中の濃度勾配が経時的に減少したことに起因すると考えられる。一方、適用液量が多い場合 (100、1000 μL) は、lag time 後の透過速度は経時的に減少しなかった (Fig. 26a,b)。このことから、薬物の適用液量を変えると累積透過量や透過速度に違いが生じることが確認できた。

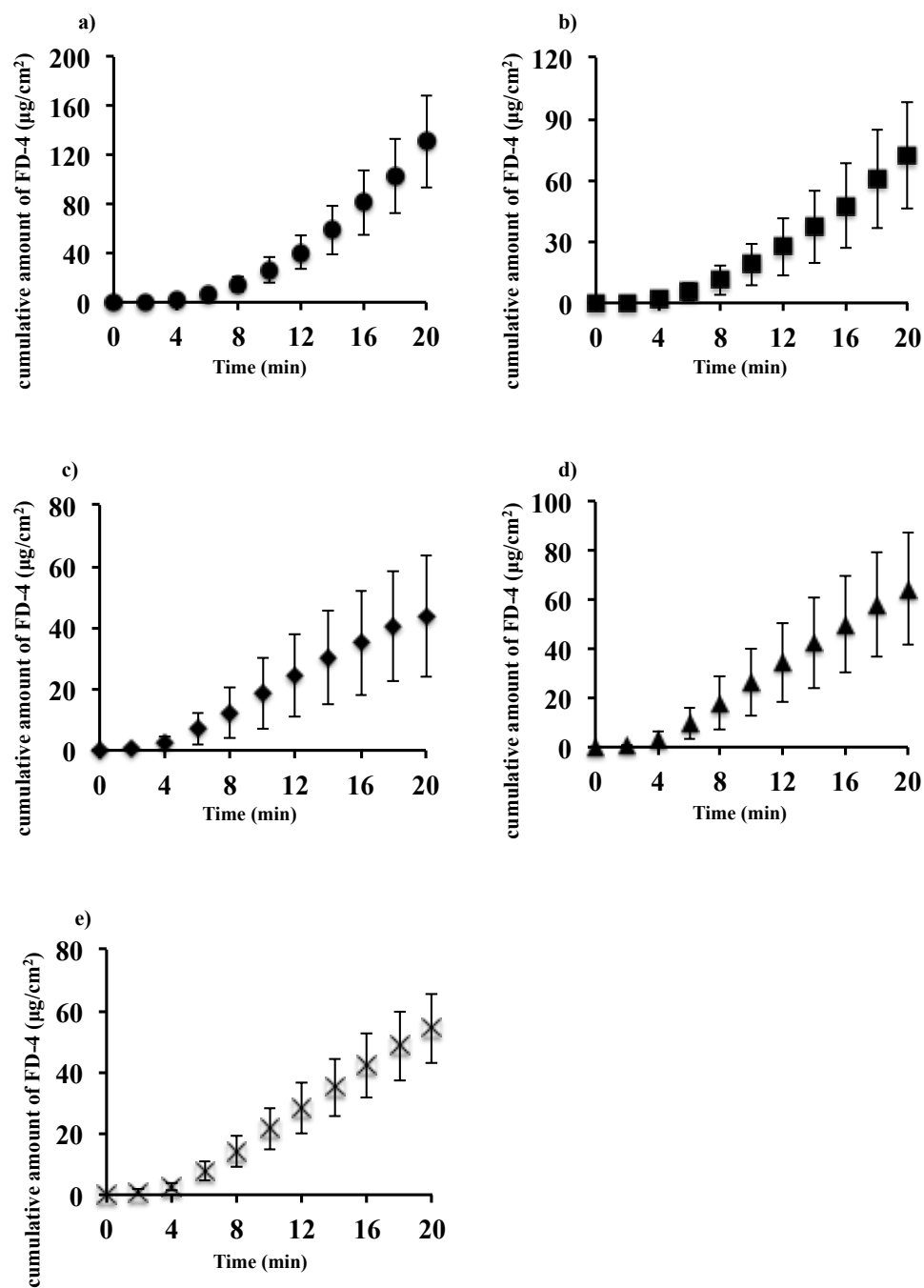


Fig. 25 Time course of the cumulative amount of FD-4 that permeated through 4% agar membrane. Symbols: \bullet : application volume 1000 μL , \blacksquare : application volume 100 μL , \blacklozenge : application volume 10 μL , \blacktriangle : application volume 10 μL , \times : application volume 0.1 μL .

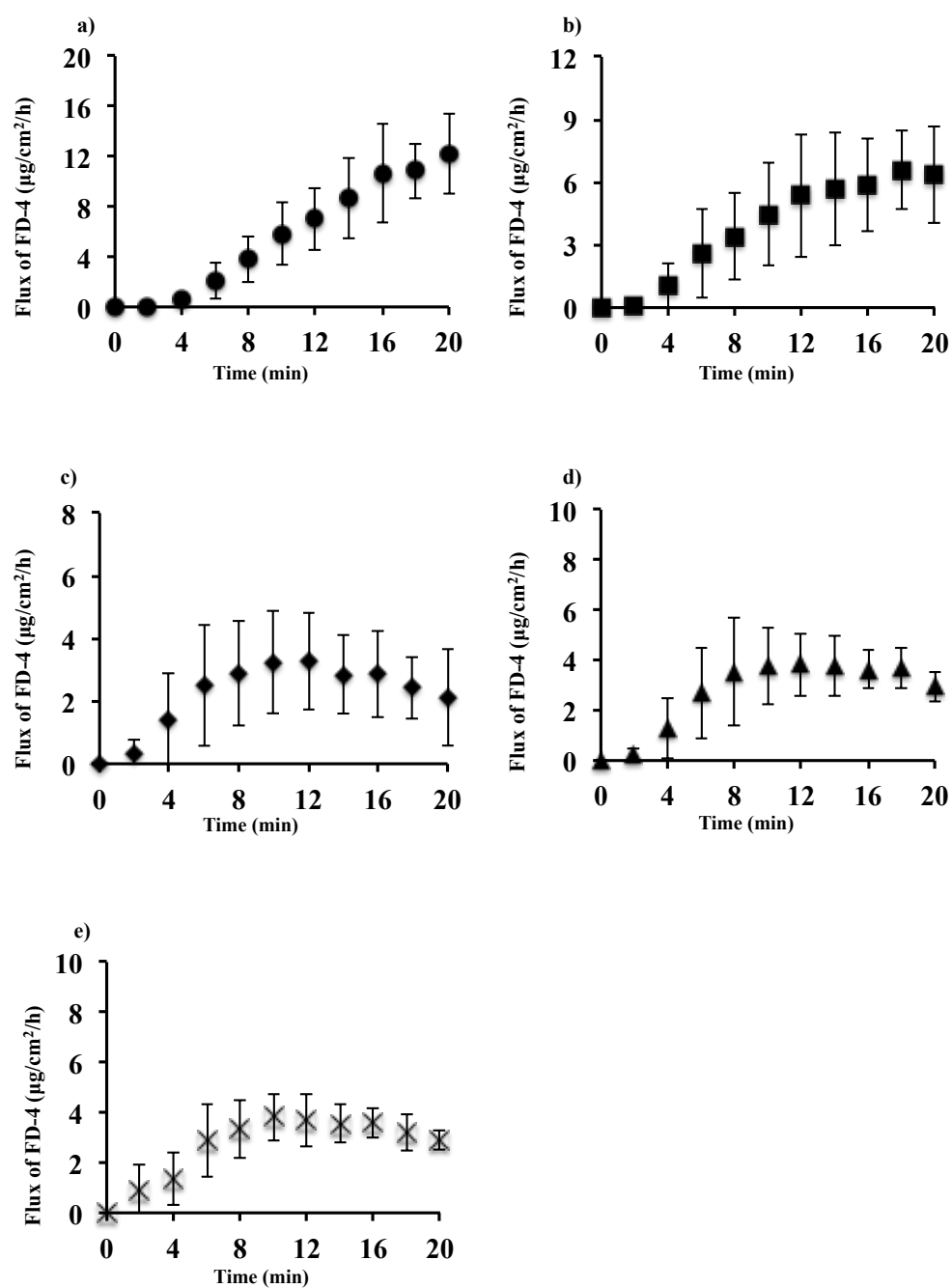


Fig. 26 Time course of the flux of FD-4 that permeated through 4% agar membrane.

Symbols: the same in Fig. 25.

2. 2. FD-4 適用後の 4%寒天膜表面分布の経時変化に及ぼす適用液量の影響

4%寒天膜表面に適用された微量薬液中の薬物は膜内に浸透するとともに膜表面で広がると考えられる。そこで、薬物の膜表面分布について検討した。Figure 27 に FD-4 溶液適用後の寒天膜表面分布の経時的変化に及ぼす種々適用液量の影響を示す。図は 25 分割した寒天膜の各ブロック中の FD-4 量を測定し、Sigmaplot を用いて 2D 等高線プロットしたものである。ここで、FD-4 の濃度分布は色調変化により表している。適用液量が 0.1 μL (Fig. 27a) では、適用直後 (図の上段) と比べ、適用 10 分後 (図の中段) で FD-4 の広がりが確認できたが、適用 10 分後と 30 分後 (図の下段) 間では差が認められなかった。このことから、適用された微量薬物は、わずかに横方向に広がるものの、薬物は速やかに膜内へ浸透すると考えられた。一方、適用液量が 1 μL (Fig. 27b) および 10 μL (Fig. 27c) では、適用直後より 10 分後、10 分後より 30 分後と時間が経過するとともに寒天表面上で FD-4 が広がった。さらに、適用液量が 100 μL (Fig. 27d)、1000 μL (Fig. 27e) では、更に広範囲に FD-4 は広がっていくことが認められた。特に、適用 30 分後では、寒天膜上の 100 mm \times 100 mm の範囲ほぼ全面に FD-4 の分布が認められた。得られた画像データより、各適用液量での寒天膜表面で FD-4 が広がった半径を測定し、これより半径の増加率 (CR) を算出した。結果を Table 4 に示す。CR 値を用いることで、薬物の広がりを定量的に評価できると考えられる。

以上より Nano-dose applicator を用いて寒天膜に適用された 0.1 μL という微量 FD-4 溶液では膜表面でのわずかな FD-4 の広がりが認められたが、FD-4 は速やかに膜内へ浸透すると考えられた。すなわち、標的部位を限定するとき、

Nano-dose applicator を用いた薬物投与が有効であることが示唆された。

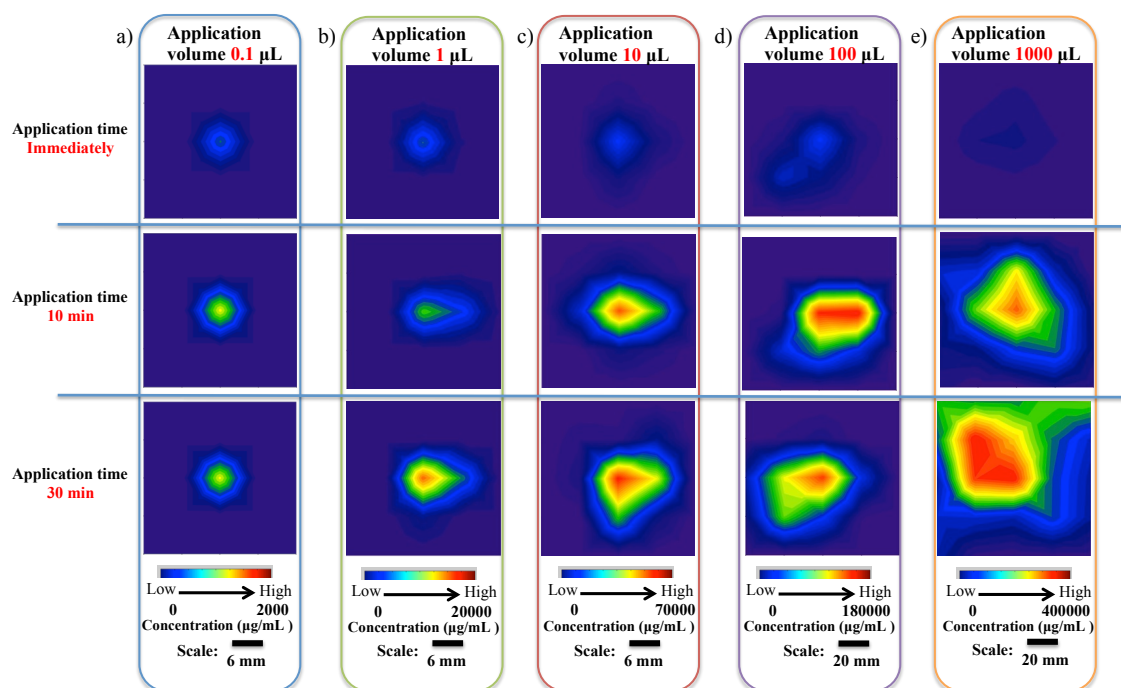


Fig. 27 Distribution of FD-4 area on 4% agar membrane surface by different application volumes at each application time a): 0.1 μL , b): 1 μL , c): 10 μL , d): 100 μL , e): 1000 μL . Upper line: immediately, middle line: 10 minutes, lower line: 30 minutes.

Table 4 Change in radius (CR) of each application volume at 10 or 30 min

Application volume (μL)	CR of 10 min	CR of 30 min
1000	1.99	N.D.
100	1.13	N.D.
10	1.21	1.35
1	1.25	1.40
0.1	1.05	1.06

2. 3. Nano-dose applicator を用いた微量薬液適用後の皮膚組織観察

実組織への応用を目指すため、モデル組織としてブタ耳皮膚を選択して、組織表面に適用された微量薬物の組織内分布について画像解析評価法を用いて調べた。各組織中の FD-4 濃度分布を調べるため、CLSM 画像より算出した stripped pig ear skin 用、full-thickness skin 用それぞれの検量線を用いた (Fig. 28a,b)。これは、方法 1. 11 に示したように CLSM 照射条件が異なるため、stripped pig ear skin と full-thickness pig ear skin で異なった蛍光強度が観察されたことによる画像から得られた蛍光強度と FD-4 皮膚中濃度の間にそれぞれ高い決定係数 (stripped skin : $R^2=0.99605$ 、full-thickness skin : $R^2=0.99667$) が得られた。Nano-dose applicator を用いて適用された微量 FD-4 の stripped pig ear skin および full-thickness pig ear skin の CLSM 画像より、適用部位を中心に深さ方向 1000 μm 、横方向 2000 μm の長方形内の濃度分布を Image J より画像解析し、得られた値を SigmaPlot にて 2D 空間に距離比を取った等高線プロットとして表した結果をそれぞれ Fig. 28c および Fig. 28d に示す。

Stripped pig ear skin に適用された FD-4 は、30 分で皮内に深さ方向だけでなく、横方向にも分布した。その浸透パターンから FD-4 の横方向への広がりの方が垂直方向の拡散より速いことが示され、このような特性の評価は薬物の組織内分布の関係を理解する上で大変重要である。

Full-thickness pig ear skin の毛嚢がない部分に適用した FD-4 の場合、12 時間経っても皮膚表面近くのみに分布した。一方、興味深いことに、毛嚢開口部に選択的に適用した FD-4 は角層を介した皮内への浸透が認められなかったが、毛幹に伝って毛嚢深部に FD-4 は移行することが観察できた (Fig. 28e)。この結果か

ら、CLSM を用いた評価は水溶性高分子量薬物である FD-4 の皮膚透過ルートの評価にも利用できると考えられた。

微量投与後の FD-4 の皮内分布は、皮膚のバリア能や皮膚中拡散性に強く依存すると考えられた。その評価において CLSM を用いた評価法は大変有用であると考えられる。

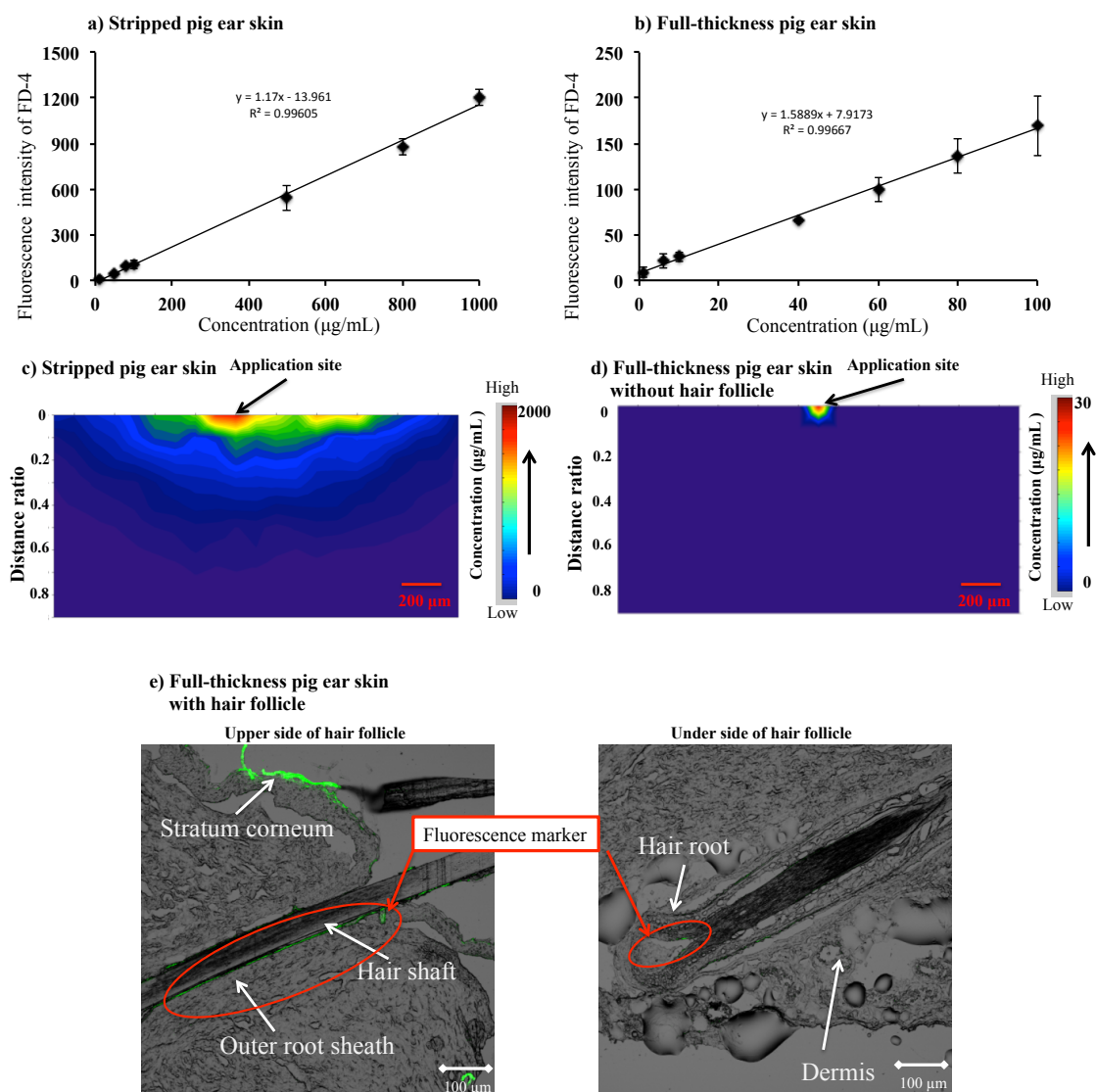


Fig. 28 Distribution of fluorescence marker in stripped (a, c), full-thickness (b, d) pig ear skin without hair follicle and full-thickness skin with hair follicle (e). Relationship between FD-4 fluorescence intensity observed by CLSM and the concentration of FD-4 applied, a): obtained condition of stripped pig ear skin by CLSM, b): obtained condition of full-thickness pig ear skin without hair follicle by CLSM. Sigmaplot images of FD-4 concentration in c): stripped pig ear skin, d): full-thickness pig ear skin without hair follicle, e) show distribution of FD-4 in full-thickness pig ear skin with hair follicle.

2. 4. Cal の皮膚透過に及ぼす CEC の影響

物理的促進法による薬物の経皮送達性の改善は古くから報告されており、iontophoresis のような微弱電流を負荷する手法は、イオン性薬物の皮膚への浸透性改善や透過性のコントロールに有用であることがいくつかのレポートで報告されている^{73, 74)}。そこで、皮膚に適用された微量薬液の皮内浸透性の促進および制御における CEC の併用効果は CLSM を用いて評価可能かについて調べた。

まず、Fig. 29a に皮膚表面に微量薬液 (0.1 μL) を適用した後に、異なる電流密度 (0.3-5.1 mA/cm^2) を負荷した後の Cal の皮膚累積透過プロファイルを示す。負荷する電流密度が高くなるにつれて皮膚累積透過量の増大も認められ、負荷する電流強度が 0.3 mA/cm^2 では、負荷なしの時と比べ Cal の累積透過量が約 3 倍高値を示し、負荷する電流密度が 5.1 mA/cm^2 では約 7 倍高い値を示した。8 時間目の Cal の皮膚累積透過量を各負荷電流密度で比較した結果を Fig. 29b に示す。Cal の 8 時間目の皮膚累積透過量は負荷する電流密度が 1.3 mA/cm^2 までは負荷電流密度の増大と共に増大したが、1.3 mA/cm^2 以上はほぼ一定であった。

次に、電流密度を 5.1 mA/cm^2 に固定し、Cal の皮膚透過量に及ぼす CEC の負荷時間の影響を調べた (Fig. 30)。CEC の負荷を初めの 5 分間とした時の、Cal の皮膚累積透過量は CEC 負荷なし時に比べ約 5 倍高値を示したが、興味深いことに CEC を実験終了までの 8 時間負荷しても皮膚累積透過量は 5 分負荷時とほぼ同等であった。すなわち、各 CEC 負荷条件での 8 時間目の Cal の皮膚累積透過量を比較しても、バラツキがあるものの、ほぼ同等の値を示すことが認められた。この結果より、皮膚表面に微量適用された薬物は CEC 適用約 5 分で表面の角層バリアを透過してほぼ皮内に移行することが示唆された。

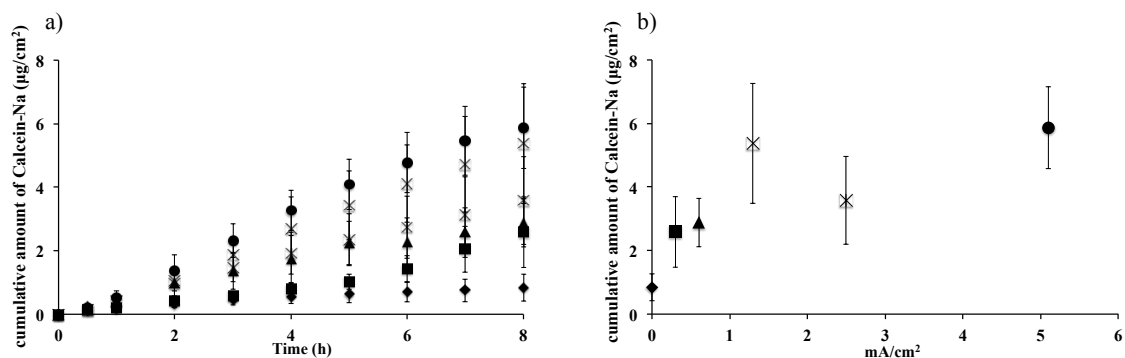


Fig. 29 Effect of current density on the permeation of Cal. a): Time courses of the cumulative amount of Cal that permeated through full-thickness pig ear skin treated with CEC application for 8 h, b): Relationship between cumulative amount of Cal permeated over 8 h permeation and CEC applied condition. Symbols: \blacklozenge : 0 mA/cm², \blacksquare : 0.3 mA/cm², \blacktriangle : 0.6 mA/cm², \times : 1.3 mA/cm², \ast : 2.5 mA/cm², \bullet : 5.1 mA/cm².

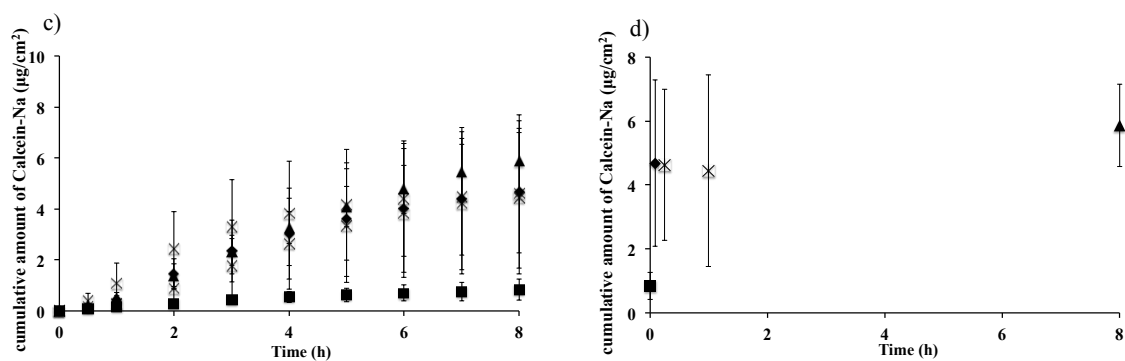


Fig. 30 Effect of treated period of CEC on the permeation of Cal. a): Time course of the cumulative amount of Cal that permeated through full-thickness pig ear skin treated with CEC application (5.1 mA/cm²), b): Relationship between the cumulative amount of Cal over 8 h and the application time of CEC applied. Symbols: \blacksquare : 0 h, \blacklozenge : 0.08 h, \times : 0.25 h, \ast : 1.0 h, \blacktriangle : 8 h.

2. 5. 短時間（5 分）CEC 併用時の Cal の皮内分布

そこで、皮内に送達された微量 Cal の皮内分布に及ぼす 5 分間 CEC 併用の影響について画像解析評価法を用いて検討した。皮膚中の Cal 濃度分布を調べるため、方法 1. 11 に示した CLSM 照射条件により観察し、CLSM 画像より同条件で作成した検量線を用いた（Fig. 31a）。Fig. 31b,c に皮膚組織切片の蛍光断面図を示す。得られた CLSM 画像（Fig. 31b, c）より適用部位を中心に深さ方向 1000 μm 、横方向 2000 μm の長方形内の濃度分布を Image J より画像解析し、得られた数値を SigmaPlot にて 2D 空間に距離比を取った等高線プロットした結果を Fig. 31d, e に示す。Fig. 31b,d は CEC を負荷しない場合の皮膚断面図および濃度分布図であるが、薬物は皮膚表面のみに分布し、皮内への浸透が認められなかった。一方、Fig. 31c,e に示すように、CEC を 5 分間負荷すると、Cal は皮内深部に分布することが認められた。このことから、皮膚に適用された微量の薬物を組織の深部や目的部位に送達するための手法として CEC を併用することが有効であり、その評価に CLSM を用いた評価が有用であることが考えられる。

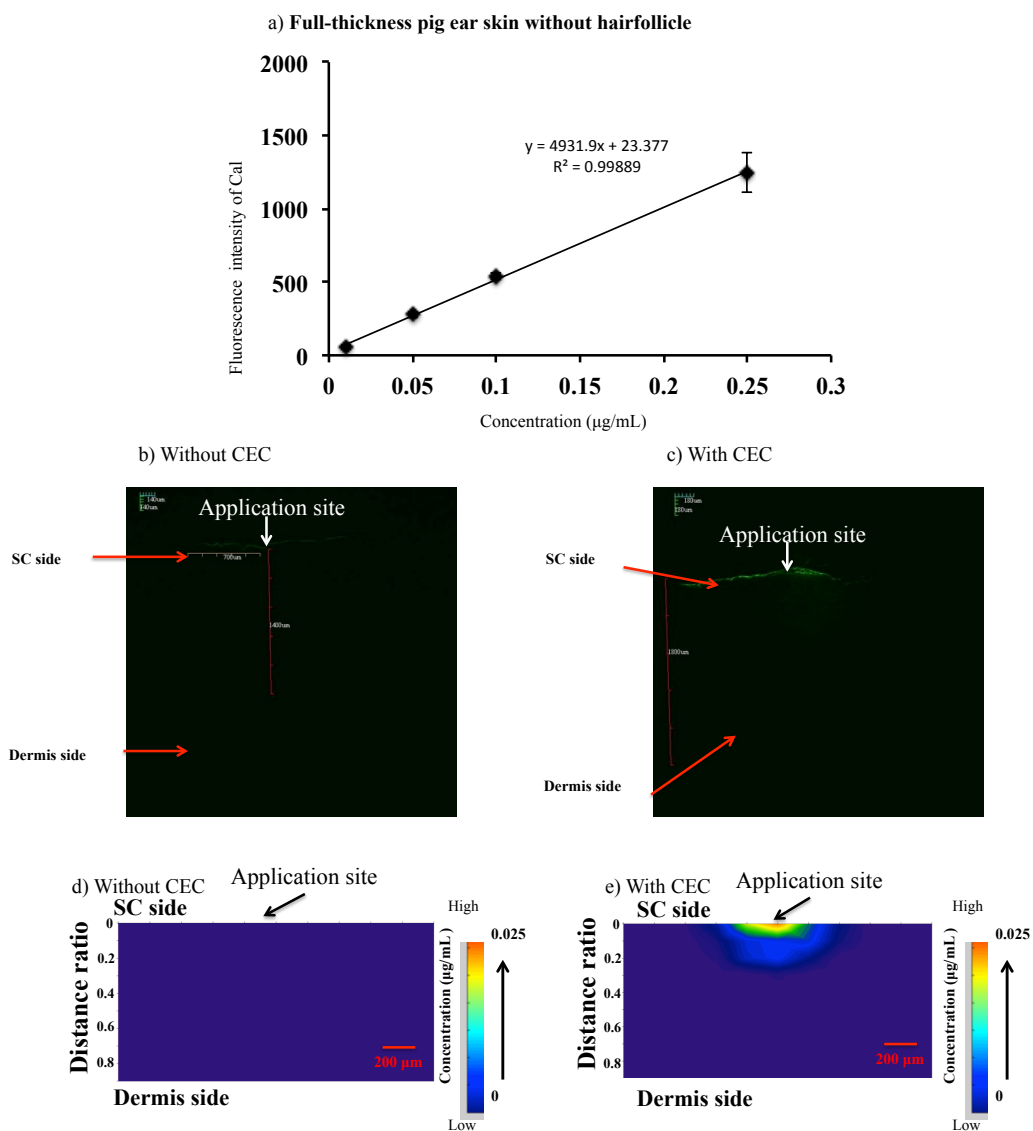


Fig. 31 Distribution of Cal in full-thickness pig ear skin without hair follicle. a) Calibration curve of Cal in full-thickness pig ear skin without hair follicle. CLSM images of full-thickness skin without hair follicle after application of Cal without b) or with c) CEC. Sigmaplot images of Cal concentration in full-thickness pig ear skin without hair follicle after its application without d) or with e) CEC.

2. 6. 脳および肝臓に送達された微量 FD-4 溶液の組織内分布

これまでの評価で Nano-dose applicator は微量薬物を皮膚局所に適用する有用なデバイスであると考えられた。そこで、本デバイスの種々組織への適用の可能性について調べるため、摘出した肝臓組織および脳組織をモデル組織として選択し、それらの組織表面に適用された微量薬物の組織内濃度分布について調べた。

各組織中の FD-4 濃度分布を調べるため、CLSM 画像より得た各検量線を用いた。すなわち、方法 1. 11 に示した脳組織における CLSM 照射条件により脳組織を観察し、得られた検量線を脳組織の実験に (Fig. 32a)、また、肝臓組織における CLSM 照射条件により肝臓組織を観察し、得られた検量線を肝臓組織の実験に (Fig. 32b)、それぞれ用いた。画像から得られた蛍光強度と FD-4 組織中濃度の間に高い決定係数 (脳組織 : $R^2=0.98313$ 、肝臓組織 : $R^2=0.99514$) が得られた。Nano-dose applicator を用いて適用された 0.1 μL の 5 mM FD-4 溶液を適用した 30 分後の脳組織 (Fig. 28c) および肝臓組織 (Fig. 28d) の CLSM 画像について、適用部位を中心に深さ方向 1000 μm 、横方向 2000 μm の長方形内の濃度分布を Image J より画像解析し、得られた数値を SigmaPlot にて 2D 空間に距離比を取った等高線プロットした結果を、それぞれ Fig. 32e と Fig. 32f に示す。各組織表面に適用された FD-4 (適用溶液量 0.1 μL) は 30 分で組織内に移行したことが蛍光画像で確認できた。適用した FD-4 は、脳組織内では適用 30 分後に約 440 μm 深さに (Fig. 32c)、また、肝臓では同じく 30 分後で 740 μm 深さにそれぞれ浸透することが確認できた (Fig. 32d)。また、本方法により、その分布は薬物

濃度分布として Fig. 32e, f のように示すことができた。このことは、CLSM を用いる方法が、他の組織でも有用であることを示している。

脳および肝臓に適用された微量薬物が、各組織内に半楕円形に分布し、その浸透パターンを評価することができたが、このような情報が蓄積することで、微小薬物を局所適用する adDDS の確立が可能とするものと期待される。本研究は、その実現のための基礎的な検討として大変有用であると思われる。

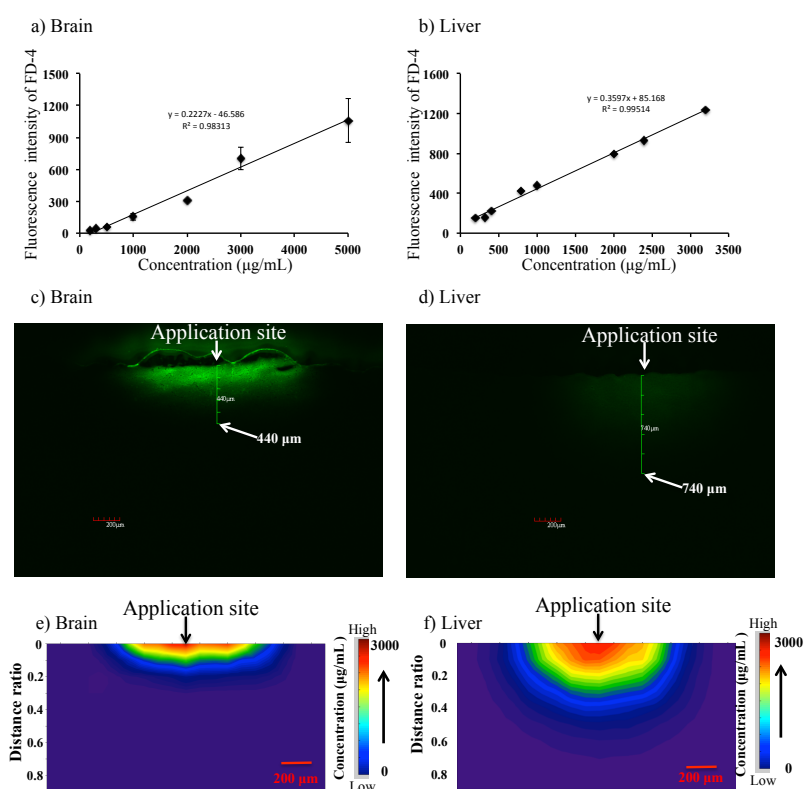


Fig. 32 Distribution of FD-4 in the brain and liver tissues. Relationship between FD-4 fluorescence intensity observed by CLSM and the concentration of FD-4 applied. a): CLSM condition using brain, b) CLSM condition using liver). CLSM images in the brain (c) and liver (d). Sigmaplot images of FD-4 concentration in the brain (e) and liver (f).

第3節 考察

微小組織局所での薬効を期待する場合には、微量の薬物を微小標的部位に送達させる必要がある。また、このことが可能となれば低い副作用かつ高い治療効果が得られる新規医療手法になる可能性がある。本章では、極少量の薬液を正確に吐出できる Nano-dose applicator を用いた微量薬液の組織微小部位への adDDS の確立のための基礎検討として、微小組織中の薬物分布の CLSM による評価を試みた。

まず、薬物の膜透過性に及ぼす適用液量の影響を明らかにするために、異なる適用液量の FD-4 溶液を 4%寒天膜に適用し、その膜透過性について調べた。その結果、適用液量によって FD-4 の累積透過量が異なることが示された。また、Nano-dose applicator を用いて寒天膜表面に適用された微量 FD-4 の膜表面での広がりが極わずかであったことから、標的部位を限定した薬物投与に本デバイスは有用であると考えられた。そこで、実組織への応用としてブタ耳皮膚（角層を有する full-thickness pig ear skin および角層を除去した stripped pig ear skin）を選択し、微量薬液（0.1 μL ）を組織表面に適用した後の薬物浸透パターンについて検討した。Stripped pig ear skin 表面に適用された微量薬物は、深さ方向と横方向の両方へ分布したが、組織表面での横方向への拡散が深さ方向への拡散より速いことが示された。Full-thickness pig ear skin の毛嚢でない部分に 0.1 μL の溶液として適用された FD-4 は、適用 12 時間でも角層を介した浸透が認められなかったが、皮膚付属器官である毛嚢部分に適用した場合、毛嚢下部への浸透が認められた。このことから、FD-4 のような水溶性高分子薬物の主な皮内浸

透ルートの評価に本方法は有用であると考えられる。さらに、full-thickness pig ear skin のように高いバリア能を持つ組織に適用された微量薬物の組織内への浸透への CEC の併用効果を本方法により調べた。その結果、CEC を負荷しない場合は薬物の full-thickness pig ear skin を介した皮内への浸透が認められなかったが、CEC を負荷すると短時間（5 min）で皮膚バリアである角層バリアを克服し、皮内深部へ送達したことが CLSM 画像とその解析により確認された。このことより、CEC を併用することで効率的な薬物送達システムを構築でき、その評価に CLSM を用いた方法が有用であると考えられた。さらに、本評価法の種々組織への適用の可能性について調べるため、肝臓組織および脳組織をモデル組織として選択して評価した結果、モデル薬物である FD-4 が浸透する深さまで評価できることが明らかとなった。

以上より、Nano-dose applicator を用いた微量薬物送達システムは必要最少量の薬物を微小病巣組織へ直接的に送達出来る新たな手法になる可能性があり、CLSM を用いた評価法はそのための基礎的研究に有用であることが示された。

第4節 小括

本章の研究結果より、Nano-dose applicator を用いた微量薬物送達は、極低用量の薬液を正確に目的部位の表面に吐出できるため、少量で高い効果を期待できる効率的な薬物送達システムに応用できる可能性が示された。すなわち、Nano-dose applicator を用いた効率的な adDDS 構築の可能性が示唆された。その達成のために、本研究で検討した CLSM を用いた微小組織内薬物分布評価法は大変有用であると思われる。

総括

タンパク医薬、ペプチド医薬や核酸医薬など活性の高いバイオ医薬品⁷⁵⁻⁷⁷⁾の多くは極少量で高い活性を示すにもかかわらず、現状では投与方法が限定されている。そのため、効率的な薬物投与方法の確立が重要と考えられる。

これまでの DDS では、薬物の生体膜透過（吸収）促進や徐放能を有する製剤や、標的組織への特異的な薬物送達に関するものであった⁷⁸⁻⁸²⁾。しかし、低用量の薬物を正確に微小目的部位に投与する技術について報告はほとんどない。さらに、微小組織に適用したわずかな量の薬物の正確な周辺組織内分布を評価する手段もほとんどない。したがって、そのような技術の確立、すなわち標的病巣組織への low dose application 手法の確立は、患者の quality of life の更なる改善に繋がると考えられる。

本研究では、副作用を抑え、かつ最大限の治療効果を期待できる微量の薬物を微小目的部位へ直接的にかつ効率的に送達するシステムの開発のための基礎的検討として、微小組織中の薬物分布を評価する方法について研究を行った。

第 1 章では、薬物の組織内分布の直接的な評価が可能と考えられる共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）を用いた蛍光画像解析法に注目した。すなわち、角層を除去した stripped pig ear skin の CLSM 画像を用いて薬物の組織中深さ方向 concentration-distance profile 解析の可能性について調べた。

第 2 章では、質量顕微鏡（iMScope）を用いた非蛍光標識薬物の組織中深さ方向 concentration-distance profile の画像解析の可能性について検討した。

また、第3章では、数ピコナノリットルの薬液を吐出できる Nano-dose applicator を選択し、微量薬液を投与した後の薬物の摘出組織内分布を評価した。なお、摘出皮膚をモデル組織として主に用い、摘出脳および肝臓についても CLSM を用いた画像解析方法にて三次元薬物分布評価を行った。

以下、3章に分けて総括する。

1. 蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価

本章では、薬物の皮内分布を CLSM 画像に基づいて解析する手法の確立を試みた。蛍光モデル薬物として FD-4 を選択して *stripped pig ear skin in vitro* 皮膚透過試験を行い、得られた透過プロファイルを Fick の拡散則で解析し、皮膚中濃度分布を計算した。また、透過試験後の皮膚組織切片の CLSM 画像を解析し、皮膚中濃度分布を求めた。その結果、CLSM 画像解析による定常状態時および非定常状態時の生きた表皮・真皮中における concentration-distance profile は、皮膚透過挙動より計算したプロファイルと極めて類似した。このことから蛍光標識薬物および CLSM を用いた解析評価法は、薬物の生きた表皮・真皮中各深度濃度評価に有用であると考えられた。

2. 非蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価

iMScope を用いた IMS 観察像を用いて得られた皮膚組織切片中の各深度での薬物分布を評価した。iMScope 観察より得られた LC の皮膚中 concentration-distance profile は拡散モデルで計算したプロファイルと同様な傾向は見られたものの一致するものではなかった。現時点でどちらの方法がより正確であるか結論を出せないが、iMScope を用いた値は、皮膚組織の各部位における薬物の存在を直接的に評価した値であり、拡散モデルに基づく予測とは異なる

る情報を含む物と考えられた。さらに、NA を用いた検討では、薬物のイオン付加の状態を含めた薬物の組織内分布評価ができたことから、iMScope を用いた IMS 法は、皮膚局所に適用された薬物の皮膚中各深度分布をそのイオン対形成の状態を含めて評価することができる有用な評価法である。

以上のことより、IMS 法は従来の測定法のように生体組織を破砕したり、薬物を抽出したりすることにより測定する手法より簡便に薬物の組織内での詳細な濃度分布を調べられる有用な方法と考えられた。しかし、測定手法の最適化や機器の精度の更なる向上が必要であり、それらをクリアすることで、より正確に薬物の組織内分布を評価でき、有用性が更に高まると考えられた。

3. ピエゾ感圧アプリーケーター (Nano-dose applicator) により投与された蛍光標識薬物の種々微小組織中の分布評価に関する検討

微量薬液投与後の組織内分布を評価するため、数ピコナノリットル単位で吐出量を制御できる Nano-dose applicator をデバイスとして選択し、微量薬液の組織微小部位への adDDS の確立のための基礎検討として、微小組織中の薬物分布の CLSM による評価を試みた。まずは、生体組織への適用に先立ち、寒天膜をモデル膜として予備的検討を行い、適用液量による FD-4 の累積透過量が異なることおよび膜表面に微量の溶液として適用された FD-4 は極わずかにしか広がらないことを示し、標的部位を限定した薬物投与に本デバイスを利用できることを確認した。次に、皮膚を実組織として選択し、得られた CLSM 像を観察した。Stripped pig ear skin 表面に適用された微量 FD-4 は、深さ方向と横方向の両方へ分布したが、その浸透パターンの解析から stripped pig ear skin では FD-4 は横方向への広がりが大きいことを明らかにした。角層を有する

full-thickness skin に適用された FD-4 は、角層を介して皮内へ浸透せず、一方、毛嚢部分に適用した場合は毛嚢下部へ浸透することが、CLSM の観察により確認できた。また、角層のような高いバリア能を有する組織に適用された微量薬物の組織内への浸透への CEC の併用効果を本画像解析法により調べた。その結果、CEC を負荷することによって、短時間で薬物の皮内浸透を CLSM 画像とその解析によって確認できた。これらのことより、微量薬物の皮内分布および浸透ルートの評価に CLSM を用いた画像解析方法が有用であると考えられた。また、他の組織への応用として、脳および肝臓をモデル組織として選択し、適用された微量 FD-4 の各組織内での分布を CLSM 画像解析にて解析した結果。各組織表面に適用された FD-4 の組織内分布を評価でき、さらに、その浸透深さは異なることを示すことができた。

以上のことより、Nano-dose applicator は、必要最少量の薬物を微小病巣組織に直接的に送達することができる新たな投与方法になると考えられた。さらに、薬物の組織内分布を可視化に出来る本画像解析法は、薬物の微小組織内動態評価に有用であることが示された。

本研究で用いた Nano-dose applicator による微量薬物の微小組織送達は新しい adDDS の構築に有用であると考えられ、本研究全体にわたって検討を行った画像解析評価法は、そのような adDDS を現実的のものとするための基礎的研究に大変有用であることが示された。本研究では、摘出組織を用いたが、今後血流による影響などを考慮した評価法へと更に発展させることが必要と考えられる。

謝辞

本研究に際し終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学・皮膚生理学講座教授 杉林 堅次 先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり御教示頂きました城西大学薬学部薬剤作用解析学講座教授 小林 大介 先生、城西大学薬学部薬品作用学講座教授 岡崎 真理 先生に深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり終始有益な、御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座准教授 藤堂 浩明 先生、東海大学医学部医学科客員准教授 畑中 朋美 先生、城西国際大学准教授 森 健二 先生に心から感謝の意を表します。

さらに、本論文作成にあたり、ご教示を頂きました城西大学薬学部生理学講座教授 加園 恵三 先生、城西大学薬学部薬剤学講座教授 従二 和彦 先生、城西大学薬学部薬品物理化学講座教授 関 俊暢 先生に深謝いたします。

最後に、本研究の実施に御協力いただきました、城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座助手 Wesam R Kadhum 先生、正木 涼介 修士をはじめとする関係諸氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) 金尾 義治, 進歩する薬物治療DDS最前線, 廣川書店 (東京、日本), 2-3 2010.
- 2) 永井 恒司, ドラッグデリバリーシステムの新展開—究極の薬物治療をめざして—, シーエムシー出版 (東京、日本), 1-11 2004.
- 3) Ravi Kumar M. N., Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3, 234-258 (2000).
- 4) Webb S. C., Canepa-Anson R., Rickards A. F., Poole-Wilson P. A., High potassium concentration in a parenteral preparation of glyceryl trinitrate. Need for caution if given by intracoronary injection, *Br. Heart J.*, 50, 295-396 (1983).
- 5) Bucur R. C., Reid L. S., Hamilton C. J., Cummings S. R., Jamal S. A., Nitrates and bone turnover (NABT) - trial to select the best nitrate preparation: study protocol for a randomized controlled trial, *Trials.*, 14, 284-297 (2013).
- 6) Trapani A. Jr., Gonçalves L. F., Pires M. M., Transdermal nitroglycerin in patients with severe pre-eclampsia with placental insufficiency: effect on uterine, umbilical and fetal middle cerebral artery resistance indices, *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 38, 389-394 (2011).
- 7) Nakagawa O., Development of artificial nucleic acids functionalized for damaged gene diagnosis, gene inhibition and delivery system, *Yakugaku Zasshi*, 134, 1319-1329 (2014).
- 8) Van der Maaden K., Jiskoot W., Bouwstra J., Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery, *J. Control. Release*, 161, 645-655 (2012).

- 9) Badran M. M., Kuntsche J., Fahr A., Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller) in vitro: dependency on needle size and applied formulation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 36, 511-523 (2009).
- 10) Prausnitz M. R., Microneedles for transdermal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 581-7 (2004).
- 11) Xie Y., Xu B., Gao Y., Controlled transdermal delivery of model drug compounds by MEMS microneedle array, *Nanomedicine.*, 1, 184-190 (2005).
- 12) Gowrishankar T.R., Pliquett U., Weaver J.C., Changes in skin structure and electrical properties following high voltage exposure, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 888, 183-194 (1999).
- 13) Matsumura Y., Maeda H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res.*, 46 6387-6392 (1986).
- 14) Makino A., Kimura S., Solid Tumor-Targeting Theranostic Polymer Nanoparticle in Nuclear Medicinal Fields, *Sci. World J.*, 2014 1-12 (2014).
- 15) Hong H., Zhang Y., Sun J., Cai W., Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles, *Nano. Today*, 4, 399-413 (2009).
- 16) Matoba T., Egashira K., Nanoparticle-mediated drug delivery system for cardiovascular disease, *Int. Heart J.*, 55, 281-286 (2014).
- 17) Markman J. L., Rekechenetskiy A., Holler E., Ljubimova J. Y., Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65, 1866-1879 (2013).

- 18) 高橋 有己, 西川 元也, 高倉 喜信, エクソソームの体内動態, *Drug Delivery System*, 29, 166-124 (2014).
- 19) Hainsworth J. D., Safety of rituximab in the treatment of B cell malignancies: implications for rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.*, 4, 12-16 (2003).
- 20) Zhou Y., Wang K., Liu Y., Song M., Song S. W., Jiang T., Spontaneous brain activity observed with functional magnetic resonance imaging as a potential biomarker in neuropsychiatric disorders, *Cogn. Neurodyn.*, 4, 275-294 (2010).
- 21) Leonard B. E., Pharmacotherapy in the treatment of Alzheimer's disease: an update, *World Psychiatry*, 3, 84-88 (2004).
- 22) Horky L. L., Gerbaudo V. H., Zaitsev A., Plesniak W., Hainer J., Govindarajulu U., Kikinis R., Dietrich J., Systemic chemotherapy decreases brain glucose metabolism, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, 1, 788-798 (2014).
- 23) Kijima S., Sasaki T., Nagata K., Utano K., Lefor A. T., Sugimoto H., Preoperative evaluation of colorectal cancer using CT colonography, MRI, and PET/CT, *World J. Gastroenterol.*, 20, 16964-16975 (2014).
- 24) Sofka C. M., Potter H. G., Adler R. S., Pavlov H., Musculoskeletal imaging update: current applications of advanced imaging techniques to evaluate the early and long-term complications of patients with orthopedic implants, *HSS. J.*, 2, 73-77 (2006).
- 25) Mitsunaga M., Nakajima T., Sano K., Choyke P. L., Kobayashi H., Near-infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate, *Bioconjug. Chem.*, 23, 604-609 (2012).

- 26) Souza J. G., Dias K., Pereira T. A., Bernardi D. S., Lopez R. F., Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods, *J. Pharm. Pharmacol.*, 66, 507-530 (2014).
- 27) Tokumoto S., Higo N., Sugibayashi K., Effect of electroporation and pH on the iontophoretic transdermal delivery of human insulin, *Int. J. Pharm.*, 326, 9-13 (2006).
- 28) Ang T. L., Eu Kwek A. B., Fock K. M., Teo E. K., Endoscopic ultrasound-guided insertion of a large diameter fully covered self-expandable metallic stent as rescue therapy for recurrent infected walled off pancreatic necrosis after surgical necrosectomy, *Endosc. Ultrasound*, 3, 245-248 (2014).
- 29) Ueda H., Mutoh M., Seki T., Kobayashi D., Morimoto Y., Acoustic cavitation as an enhancing mechanism of low-frequency sonophoresis for transdermal drug delivery, *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 916-920 (2009).
- 30) Gupta R., Parelkar S. V., Sanghvi B., Mesenchymal hamartoma of the liver, *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.*, 30, 141-143 (2009).
- 31) Lebeau D., Reiller P. E., Lamouroux C., Direct analysis of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on concrete by reactive-desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Talanta*, 132, 877-883 (2015).
- 32) Fröhlich S., Putz B., Schachner H., Kerjaschki D., Allmaier G., Marchetti-Deschmann M., Renopathological microstructure visualization from formalin fixed kidney tissue by matrix-assisted laser/desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging, *Balkan. J. Med. Genet.*, 15, 13-16 (2012).

- 33) Ruh H., Salonikios T., Fuchser J., Schwartz M., Sticht C., Hochheim C., Wirnitzer B., Gretz N., Hopf C., MALDI imaging MS reveals candidate lipid markers of polycystic kidney disease, *J. Lipid Res.*, 54, 2785-2794 (2013).
- 34) Mishra A., Schüz A., Engelmann J., Beyerlein M., Logothetis N. K., Canals S., Biocytin-derived MRI contrast agent for longitudinal brain connectivity studies, *ACS Chem. Neurosci.*, 2, 578-587 (2011).
- 35) Kiistala U., Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis, *J. Invest. Dermatol.*, 50, 129-137 (1968).
- 36) Surber C., Wilhelm K. P., Bermann D., Maibach H. I., *In vivo* skin penetration of acitretin in volunteers using three sampling techniques, *Pharm. Res.*, 10, 1291-1294 (1993).
- 37) Pershing L. K., Silver B. S., Krueger G. G., Shah V. P., Skelley J. P., Feasibility of measuring the bioavailability of topical betamethasone dipropionate in commercial formulations using drug content in skin and a skin blanching bioassay, *Pharm. Res.*, 9, 45-51 (1992).
- 38) Rougier A., Dupuis D., Lotte C., Roguet R., Schaefer H., *In vivo* correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption, *J. Invest. Dermatol.*, 81, 275-278 (1983).
- 39) Shah V. P., Flynn G. L., Yacobi A., Maibach H. I., Bon C., Fleischer N. M., Franz T. J., Kaplan S. A., Kawamoto J., Lesko L. J., Marty J. P., Pershing L. K., Schaefer H., Sequeira J. A., Shrivastava S. P., Wilkin J., Williams R. L., Bioequivalence of topical

- dermatological dosage forms-methods of evaluation of bioequivalence, *Pharm. Res.*, 15, 167-171 (1998).
- 40) Tsang M., Guy R. H., Effect of Aqueous Cream BP on human stratum corneum *in vivo*, *Br. J. Dermatol.*, 165, 954-958 (2010).
 - 41) Lodén M., Ungerth L., Serup J., Changes in european legislation make it timely to introduce a transparent market surveillance system for cosmetics, *Acta Derm. Venereol.*, 87, 485-492 (2007).
 - 42) N'Dri-Stempfer B., Navidi W. C., Guy R. H., Bunge A. L., Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics, *Pharm. Res.*, 26, 316-328 (2009)
 - 43) Rim J. E., Pinsky P. M., Van Osdol W. W., Using the method of homogenization to calculate the effective diffusivity of the stratum corneum., *J. Membr. Sci.*, 20, 174-182 (2007).
 - 44) Sugibayashi K, Todo H, Oshizaka T, Owada Y., Mathematical model to predict skin concentration of drugs: toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as animal testing alternative., *Pharm. Res.*, 27,134-142 (2010).
 - 45) Alfred M., Physical pharmacy, 廣川書店 (東京、日本), 293-295 (1993).
 - 46) Oshizaka T., Kikuchi K., Kadhum W. R., Todo H., Hatanaka T., Wierzbka K., Sugibayashi K., Estimation of skin concentrations of topically applied lidocaine at each depth profile, *Int. J. Pharm.*, 475, 292-297 (2014).

- 47) Marwick T. H., Schwaiger M., The future of cardiovascular imaging in the diagnosis and management of heart failure, part 2: clinical applications, *Circ. Cardiovasc. Imaging*, 1, 162-170 (2008).
- 48) Gyöngyösi M., Blanco J., Marian T., Trón L., Petneházy O., Petrasi Z., Hemetsberger R., Rodriguez J., Font G., Pavo I. J., Kertész I., Balkay L., Pavo N., Posa A., Emri M., Galuska L., Kraitchman D. L., Wojta J., Huber K., Glogar D., Serial noninvasive in vivo positron emission tomographic tracking of percutaneously intramyocardially injected autologous porcine mesenchymal stem cells modified for transgene reporter gene expression, *Circ. Cardiovasc. Imaging*, 1, 94-103 (2008).
- 49) Nakada T., Myths and truths in functional MRI: a basic guide for practitioners, *Magn. Reson. Med. Sci.*, 1, 89-107 (2002).
- 50) Thompson J. L., Urban N., Abi-Dargham A., How have developments in molecular imaging techniques furthered schizophrenia research?, *Imaging Med.*, 1, 135-153 (2009).
- 51) Liu Z., Yan Y., Liu S., Wang F., Chen X., Ga labeled RGD-bombesin heterodimeric peptides for PET imaging of breast cancer, *Bioconjug. Chem.*, 20, 1016-25 (2009).
- 52) Wu J., Pan D., Chung L. W., Near-infrared fluorescence and nuclear imaging and targeting of prostate cancer, *Transl. Androl. Urol.*, 2, 254-264 (2013).
- 53) Wang X., Ramström O., Yan M., A photochemically initiated chemistry for coupling underivatized carbohydrates to gold nanoparticles, *J. Mater. Chem.*, 9, 8944-8949 (2009).

- 54) Luef B., Neu T. R., Peduzzi P., Imaging and quantifying virus fluorescence signals on aquatic aggregates: a new method and its implication for aquatic microbial ecology, *FEMS. Microbiol. Ecol.*, 68, 372-380 (2009).
- 55) Vukojevic V., Heidkamp M., Ming Y., Johansson B., Terenius L., Rigler R., Quantitative single-molecule imaging by confocal laser scanning microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105, 18176-18181 (2008).
- 56) Hada N., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Sugibayashi K., Cultured skin loaded with tetracycline HCl and chloramphenicol as dermal delivery system: Mathematical evaluation of the cultured skin containing antibiotics., *J. Control. Release*, 108, 341-350 (2005).
- 57) Geinoz S., Rey S., Boss G., Bunge A.L., Guy R.H., Carrupt P.A., Reist M., Testa B., Quantitative structure: Permeation relationships for solute transport across silicone membranes, *Pharm. Res.*, 19, 1622-1629 (2002).
- 58) Sato K., Mitsui N., Hasegawa T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Potential usefulness of solubility index for prediction of the skin permeation rate of 5-ISMN from pressure-sensitive adhesive tape, *J. Control. Release*, 73, 269-277 (2001).
- 59) Sugibayashi K., Hayashi T., Matsumoto K., Hasegawa T., Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin, *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19, 352-362 (2004).

- 60) Takeuchi H., Ishida M., Furuya A., Todo H., Urano H., Sugibayashi K., Influence of skin thickness on the in vitro permeabilities of drugs through sprague-dawley rat or yucatan micropig skin, *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 192-202 (2012).
- 61) Norlida A. O., Phang K. S., Histomorphology of aberrant crypt foci in colorectal carcinoma, *Malays. J. Pathol.*, 32, 111-116 (2010).
- 62) Lieberman K. A., Wasenko J. J., Schelper R., Swarnkar A., Chang J. K., Rodziewicz G. S., Tanycytomas: a newly characterized hypothalamic-suprasellar and ventricular tumor, *AJNR. Am. J. Neuroradiol.*, 24, 1999-2004 (2003).
- 63) Landgraf R. R., Prieto Conaway M. C., Garrett T. J., Stacpoole P. W., Yost R. A., Imaging of lipids in spinal cord using intermediate pressure matrix-assisted laser desorption-linear ion trap/Orbitrap MS, *Anal. Chem.*, 81, 8488-8495 (2009).
- 64) Feng C. H., Lu C. Y., A new matrix for analyzing low molecular mass compounds and its application for determination of carcinogenic areca alkaloids by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.*, 649, 230-235 (2009).
- 65) Cameron L. C., Mass Spectrometry Imaging: facts and perspectives from a non-mass spectrometrists point of view, *Methods*, 57, 417-422 (2012).
- 66) Kriegsmann M., Seeley E. H., Schwarting A., Kriegsmann J., Otto M., Thabe H., Dierkes B., Biehl C., Sack U., Wellmann A., Kahaly G. J., Schwamborn K., Caprioli R. M., MALDI MS imaging as a powerful tool for investigating synovial tissue, *Scand. J. Rheumatol.*, 41, 305-309 (2012).

- 67) Takai N., Tanaka Y., Saji H., Quantification of small molecule drugs in biological tissue sections by imaging mass spectrometry using surrogate tissue-based calibration standards, *Mass Spectrom.*, 3, 1-7 (2014).
- 68) Hu L., Sun H., Zhao Q., Han N., Bai L., Wang Y., Jiang T., Wang S., Multilayer encapsulated mesoporous silica nanospheres as an oral sustained drug delivery system for the poorly water-soluble drug felodipine, *Mater Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 47, 313-324 (2015).
- 69) Fernandes-Cunha G. M., Gouvea D. R., Fulgêncio G. D., Rezende C. M., da Silva G. R., Bretas J. M., Fialho S. L., Lopes N. P., Silva-Cunha A., Development of a method to quantify clindamycin in vitreous humor of rabbits' eyes by UPLC-MS/MS: Application to a comparative pharmacokinetic study and *in vivo* ocular biocompatibility evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 102C, 346-352 (2014).
- 70) Hama S., Kogure K., Nanoparticles consisting of tocopheryl succinate are a novel drug-delivery system with multifaceted antitumor activity, *Biol. Pharm. Bull.*, 37, 196-200 (2014).
- 71) Lautenschläger C., Schmidt C., Fischer D., Stallmach A., Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 71, 58-76 (2014).
- 72) Minko T., Rodriguez-Rodriguez L., Pozharov V., Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65, 1880-1895 (2013).
- 73) Kanebako M., Inagi T., Takayama K., Transdermal delivery of indomethacin by iontophoresis, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 779-782 (2002).

- 74) Kigasawa K., Miyashita M., Kajimoto K., Kanamura K., Harashima H., Kogure K.,
Efficient intradermal delivery of superoxide dismutase using a combination of
liposomes and iontophoresis for protection against UV-induced skin damage, *Biol.*
Pharm. Bull., 35, 781-785 (2012).
- 75) Chen M., Kumar S., Anselmo A. C., Gupta V., Slee D. H., Muraski J. A., Mitragotri
S., Topical delivery of Cyclosporine A into the skin using SPACE-peptide, *J. Control.*
Release, 14, 763-769 (2014).
- 76) Hao J., Kwissa M., Pulendran B., Murthy N., Peptide crosslinked micelles: a new
strategy for the design and synthesis of peptide vaccines, *Int. J. Nanomedicine*, 1,
97-103 (2006).
- 77) Kostanski J. W., Dani B. A., Reynolds G. A., Bowers C. Y., DeLuca P. P.,
Evaluation of Orntide microspheres in a rat animal model and correlation to in vitro
release profiles, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 1, 4-16 (2000).
- 78) Fukushima K., Ise A., Morita H., Hasegawa R., Ito Y., Sugioka N., Takada K.,
Two-layered dissolving microneedles for percutaneous delivery of peptide/protein
drugs in rats, *Pharm. Res.*, 28, 7-21 (2011).
- 79) He Z. Y., Chu B. Y., Wei X. W., Li J., Edwards C. K., Song X. R., He G., Xie Y. M.,
Wei Y. Q., Qian Z. Y., Recent development of poly(ethylene glycol)-cholesterol
conjugates as drug delivery systems, *Int. J. Pharm.*, 469, 168-178 (2014).
- 80) Efthimiadou E. K., Tapeinos C., Chatzipavlidis A., Boukos N., Fragogeorgi E.,
Palamaris L., Loudos G., Kordas G., Dynamic in vivo imaging of dual-triggered

microspheres for sustained release applications: synthesis, characterization and cytotoxicity study, *Int. J. Pharm.*, 461, 54-63 (2014).

- 81) Meng L., Huang W., Wang D., Huang X., Zhu X., Yan D., Chitosan-based nanocarriers with pH and light dual response for anticancer drug delivery, *Biomacromolecules*, 14, 2601-2610 (2013).
- 82) Sakagami M., Sakon K., Kinoshita W., Makino Y., Enhanced pulmonary absorption following aerosol administration of mucoadhesive powder microspheres, *J. Control. Release*, 77, 117-129 (2001).